



---

VÂNIA CARLA SILVA PANKIEVICZ

IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS SEQUÊNCIAS  
REGULATÓRIAS DOS GENES DO SISTEMA DE  
SECREÇÃO DO TIPO III DE *Herbaspirillum seropedicae*

---

CURITIBA

2010

VÂNIA CARLA SILVA PANKIEVICZ

IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS DOS GENES  
DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III DE *Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rose Adele Monteiro

CURITIBA

2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Emanuel M. de Souza pela sua orientação, discussões e ensinamentos fundamentais para minha formação.

À professora Rose Adele pelo apoio, discussões, sugestões e coorientação.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio e aos demais professores do grupo pelas discussões e contribuições durante as reuniões.

Agradeço aos técnicos Roseli Prado e Valter pela amizade, atenção e auxílio em todos os momentos e à Dona Julieta, pela prestatividade e carinho.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que permitiram a realização deste trabalho. À Dona Marilza pelo auxílio e apoio.

Agradeço a todos os colegas do grupo e principalmente aos amigos do laboratório 275 e 279 por toda ajuda, paciência, amizade e bons momentos compartilhados. Ao Marco A. S. Kadowaki pela concessão da estirpe mutante MK1 de *H. seropedicae* e por todo o tempo dispensado em me auxiliar.

Aos amigos do grupo de interação Planta-Bactéria pelas discussões e sugestões, principalmente à Michelle Tadra e Anelis pelos ensinamentos e amizade.

Às grandes amigas Mônica e Marina pelos almoços, dedicação, companheirismo, conselhos, carinho e amizade.

Aos companheiros de dança pelos finais de semana de alegria que contribuíram para meu bem estar e força para a conclusão deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudo

Um agradecimento muito especial à Deus por me conceder esta oportunidade tendo ao meu lado pessoas que me fortalecem. Agradeço todo o incentivo da minha família, ao carinho de meu pai Jader e meu irmão Daniel. Ao meu irmãozinho Eduardo por todo amor e alegria. Ao Alex pelo amor incondicional e por compartilhar todos os momentos ao meu lado. Ao Humberto e a minha querida mãe, Rosângela, pelo seu amor e conselhos que incentivam e fortalecem.

TERMO DE APROVAÇÃO

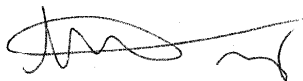
VÂNIA CARLA SILVA PANKIEVICZ

IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS DOS  
GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III DE *Herbaspirillum*  
*seropedicae*

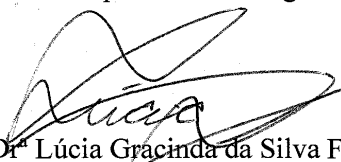
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



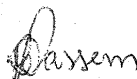
Prof<sup>a</sup> Dr Emanuel Maltempi de Souza (Orientador)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr<sup>a</sup> Luiza Maria de Araújo  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr<sup>a</sup> Lúcia Gracinda da Silva Froufe  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr<sup>a</sup>. Roseli Wassem  
Departamento de Genética – UFPR

Curitiba, 26 de fevereiro de 2010.

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, fixadora de nitrogênio, endofítica, encontrada em associação com plantas de interesse comercial, como milho, cana-de-açúcar e arroz, sem causar danos a planta hospedeira. Muitas bactérias dependem do sistema de secreção do tipo três (SST3), uma maquinaria especializada para a secreção de proteínas, para interagir com seus hospedeiros. Este sistema é codificado por um *cluster* de aproximadamente 20 genes chamados de *hrp/hrc*. Os organismos fitopatogênicos que possuem este sistema são divididos em dois grupos de acordo com a estrutura do operon *hrp* e da regulação da expressão gênica. No grupo I os genes *hrp* são regulados por HrpL, um fator sigma alternativo. A expressão do gene *hrpL*, em algumas bactérias, é controlada pelas proteínas RpoN e HrpRS. Os fatores sigma HrpL são altamente conservados e reconhecem uma sequência consenso, denominada "*hrp-box*". No grupo II, o operon *hrp* é ativado por uma proteína da família AraC. A expressão gênica da proteína ativadora é regulada por HrpG. Análises de sequências revelaram que *H. seropedicae* possui uma região com produtos similares a proteínas Hrp/Hrc de organismos que contêm o SST3. Em *H. seropedicae* o regulador dos genes *hrp* parece ser um híbrido entre as cascatas regulatórias dos grupos I e II, pois possui o gene que codifica o fator sigma HrpL e o que codifica o ativador HrpG. Neste operon de *H. seropedicae* foram identificadas três possíveis sequências *hrp-box* (*hrp-box1*, *hrp-box2* e *hrp-box3*). Para estudar a expressão dos genes *hrp*, estas prováveis sequências regulatórias foram amplificadas e subclonadas em um vetor que permite a construção de uma fusão transcricional *lacZ*. A atividade foi analisada em estirpes do tipo selvagem e mutante *hrpL*<sup>-</sup> de *H. seropedicae*. Para o estudo da regulação da expressão dos genes *hrp* é essencial um meio adequado de indução; para isso, a expressão dos promotores *hrp-box* foi testada em meios indutores de genes *hrp* XOM1 e XOM2 e em meio NFbHPN-Malato contendo extrato de cana-de-açúcar, cloreto de cálcio ou ácido salicílico. A expressão dos promotores *hrp-box1* e *hrp-box2* foi menor na estirpe mutante que na selvagem, sugerindo o envolvimento de HrpL na ativação destes promotores. A proteína HrpL de *H. seropedicae* não foi capaz de ativar a expressão dos promotores *hrp-box1*, *hrp-box2* e *hrp-box3* em *E. coli*. O promotor do gene *hrpL* também foi clonado no vetor pMP220 e a expressão do mesmo foi testada em estirpes selvagens e mutante *hrpL*<sup>-</sup>, no entanto não foi possível encontrar uma condição de ativação deste promotor. Adicionalmente, ensaios em planta foram feitos para testar a capacidade dos mutantes *hrpL*<sup>-</sup> e *hrcN* de *H. seropedicae* de aderir e colonizar plantas de arroz e milho. Aparentemente o mutante *hrpL*<sup>-</sup> foi capaz de colonizar endofiticamente mais as raízes de arroz que o selvagem. Finalmente, em tomateiro Micro-Tom foram infiltradas estirpes de *H. seropedicae* contendo plasmídeos expressando a proteína de virulência AvrPtoB, que causa resposta hipersensitiva (HR) em *P. syringae*. Entretanto, não houve aparecimento de HR causada pela secreção desta proteína por *H. seropedicae*. Estas análises, juntamente com os futuros ensaios destes promotores *in vivo* poderão contribuir de forma significativa para o esclarecimento do funcionamento e regulação do sistema de secreção do tipo III em *H. seropedicae*.

Palavras-chave: Sistema de secreção do tipo três, SST3, *H. seropedicae*, HrpL, *hrp-box*

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is a nitrogen-fixer found in endophytic association with economically important *Gramineae*. Many bacteria rely on the type III secretion system (T3SS), a specialized machinery for protein secretion, to interact with their hosts. This system is encoded by a cluster of approximately 20 hypersensitive response and pathogenicity (*hrp*) genes. The phytopathogenic bacteria that possess this system are divided into two major groups according to the *hrp* operon structure and the regulatory system controlling gene expression. In the organisms of group I the *hrp* genes are regulated by HrpL, an alternative sigma factor, whose expression is controlled by the RpoN and HrpRS proteins. HrpL proteins are highly conserved and recognize a consensus sequence, named the “*hrp box*”. In the group II, the *hrp* operons are activated by an AraC-like activator, whose expression, in turn, is stimulated by HrpG. Sequence analysis showed that the *H. seropedicae* genome contains genes coding for Hrp/Hrc proteins of the T3SS. In *H. seropedicae* the regulation of *hrp* operons seems to be a hybrid between the regulatory cascades of group I and II, since it has the gene which encodes the HrpL sigma factor and the activator HrpG. Three putative *hrp-boxes* (*hrp-box1*, *hrp-box2* and *hrp-box3*) were identified upstream of the *hrp* genes of *H. seropedicae*. To study the expression of *hrp* genes, these putative *hrp-boxes* were amplified and subcloned into a vector which contains a promoter-less *lacZ* gene, and their expression analysed in the wild type and *hrpL* mutant strains of *H. seropedicae*. To analyze the regulation of *hrp* expression an appropriate *hrp*-inducing medium is essential; for this we have tested the *hrp*-inducing media XOM1 and XOM2, and NFbHPN-Malate containing sugar cane extract, calcium chloride or salicylic acid. The activity of the putative promoters *hrp-box1* and *hrp-box2* in the *hrpL* mutant strain was lower than in the wild type, suggesting the involvement of HrpL in the activation of HrpL-dependent promoters. The *H. seropedicae* HrpL protein was not able to activate the expression of the promoters *hrp-box1*, *hrp-box2* and *hrp-box3* in *E. coli*. The *hrpL* promoter was also cloned in the promoter-less *lacZ* vector pMP220 and its activity tested in the wild type and mutant *hrpL*<sup>-</sup> strains, however no inducible condition was found for this promoter. Additional assays in plant were performed in rice and maize to test the ability of *hrpL*<sup>-</sup> and *hrcN* mutants to adhere and colonise these plant roots. The results indicated that apparently the *hrpL*<sup>-</sup> mutant was able to colonise the roots of rice more efficiently than the wild type. Finally, strains of *H. seropedicae* containing plasmids expressing the virulence protein AvrPtoB from *P. syringae*, which causes hypersensitive response in non-host plants, were infiltrated into tomato cv. Micro-Tom leaves, but no hypersensitive response was apparent. These analyses suggest that the type III secretion system of *H. seropedicae* is involved in endophytic colonization of graminaceous plants.

Key words: Type three secretion system, T3SS, *H. seropedicae*, HrpL, *hrp-box*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura esquemática de três famílias de injetossomas bacteriano. ....	28
FIGURA 2: Reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco.....	29
FIGURA 3: Modelo de regulação dos genes <i>hrp/hrc</i> em bactérias fitopatogênicas. .	31
FIGURA 4: Sequências conservadas dos promotores de genes de patogenicidade e resposta hipersensitiva.....	32
FIGURA 5: Comparação da organização dos genes <i>hrp/hrc</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>P. syringae</i> , <i>E. amylovora</i> , <i>R. solanacearum</i> e <i>X. campestris</i> . ....	39
FIGURA 6: Provável organização transcricional dos <i>operons</i> do grupo de genes <i>hrp/hrc</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (GENOPAR).....	40
FIGURA 7: Vaso utilizado para transplântio de plântulas de tomate Micro-Tom.....	60
FIGURA 8: Esquema de obtenção do mutante MK1 de <i>H. seropedicae</i> por Marco Antônio S. Kadowaki (comunicação pessoal).....	61
FIGURA 9: Esquema representativo de obtenção do mutante <i>H. seropedicae</i> MK1 com as regiões de anelamento dos <i>primers</i> utilizados para confirmação da mutação. ....	66
FIGURA 10: Perfil eletroforético dos produtos das reações de PCR para confirmação da mutação do gene <i>hrpL</i> na estirpe MK1 de <i>H. seropedicae</i> .....	68
FIGURA 11: Alinhamento das sequências dos promotores HrpL-dependentes mostrando a similaridade da sequência <i>hrp-box1</i> , <i>hrp-box2</i> e <i>hrp-box3</i> com a sequência consenso <i>hrp-box</i> demonstrada por FERREIRA (2006). Alinhamento realizado utilizando o programa BioEdit. ....	69
FIGURA 12: Perfil eletroforético de clones contendo as regiões promotoras <i>hrp-box</i> . ....	70
FIGURA 13: Representação esquemática das regiões promotoras HrpL-dependentes subclonadas no vetor de fusão pMP220.....	71
FIGURA 14: Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a expressão dos promotores HrpL-dependentes das fusões pMP <i>hrp-box1</i> , pMP <i>hrp-box1</i> invertido inseridas nas estirpes selvagem (SMR1) e mutante <i>hrpL</i> <sup>-</sup> (MK1) de <i>H. seropedicae</i> . ....	76
FIGURA 15: Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a expressão dos promotores HrpL-dependentes das fusões pMP <i>hrp-box2</i> , pMP <i>hrp-box2</i> invertido	

inseridas nas estirpes selvagem (SMR1) e mutante <i>hrpL</i> <sup>-</sup> (MK1) de <i>H. seropedicae</i> . .....	78
FIGURA 16: Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a expressão dos promotores HrpL-dependentes das fusões pMP <i>hrp</i> -box3, pMP <i>hrp</i> -box3 invertido inseridas nas estirpes selvagem (SMR1) e mutante <i>hrpL</i> <sup>-</sup> (MK1) de <i>H. seropedicae</i> . .....	79
FIGURA 17: Expressão de HrpL em <i>E. coli</i> DH10B contendo o plasmídeo pDK7- HrpL e induzida com 1mM de IPTG. ....	81
FIGURA 18: Expressão dos promotores HrpL-dependentes em <i>E. coli</i> DH10B expressando a proteína HrpL. ....	82
FIGURA 19: Esquema representativo da região intergênica <i>orf</i> -hipotética/ <i>hrpL</i> . ....	84
FIGURA 20: Perfil eletroforético do produto de PCR para obtenção da região promotora do gene <i>hrpL</i> em gel de agarose 1% e tampão TBE 1X. ....	84
FIGURA 21: Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a expressão de promotor do gene <i>hrpL</i> das fusões pMP220 <i>hrpL</i> intergenic e pPW452 <i>hrpL</i> intergenic inseridas em estirpes selvagem e mutante MK1 de <i>H. seropedicae</i> . ....	86
FIGURA 22: Adesão e colonização de plantas de arroz pelas estirpes de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> SmR1 selvagem, MK1 e RAMHN1. ....	88
FIGURA 23: Adesão e colonização de plantas de milho pelas estirpes de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> SmR1 selvagem, MK1 e RAMHN1. ....	89
FIGURA 24: Fotos das folhas de tomate Micro-Tom inoculadas com as estirpes de <i>H. seropedicae</i> SmR1. ....	93



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> E <i>Escherichia coli</i> .....	43
TABELA 2: ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS .....	45
TABELA 3: PLASMÍDEOS .....	46
TABELA 4: SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE DESNATURANTE DE PROTEÍNA .....	62
TABELA 5: GEL DE EMPILHAMENTO.....	63
TABELA 6: GEL SEPARADOR .....	63
TABELA 7: NOME E SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS UTILIZADOS PARA CONFIRMAR O MUTANTE MK1.....	66
TABELA 8: VALORES DAS ATIVIDADES $\beta$ -GALACTOSIDASE DOS ENSAIOS EM MEIO INDUTOR XOM2 CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO .....	73
TABELA 9: VALORES DAS ATIVIDADES $\beta$ -GALACTOSIDASE DOS ENSAIOS EM MEIO INDUTOR XOM1 CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp	Ampicilina
atm	Unidade de pressão atmosférica
ATP	5' trifosfato de adenosina
ATPase	Enzima que catalisa a hidrólise do ATP
BSA	Albumina de soro bovino
Cm	Cloranfenicol
D.O	Densidade óptica
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	5' trifosfato de 2' desoxinucleotideo
EDTA	Acido etilenodiamino-tetra-acético (Ethylenediamine tetra-acetic acid)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica ( <i>enterohemorrhagic E. coli</i> )
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica ( <i>enteropathogenic E. coli</i> )
EPS	Exopolissacarideo
g	grama
h	hora
HR	Resposta de Hipersensibilidade ou Resposta Hipersensitiva
IAHP	proteínas homólogas associadas a IcmF ( <i>IcmF-associated homologous proteins</i> )
IPTG	$\beta$ -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
kDa	quilo Dalton
Km	canamicina
K $\Omega$	quiloohms
L	litro
M	molar
mg	miligrama
Mini-prep	Mini preparação de plamídeos
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mmol	milimol
MT	Micro-Tom
NB-LRR	<i>Nuclear-Binding and Leucine-Rich Repeat</i>

ng	nanograma
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo
PAIs	ilha de patogenicidade ( <i>Pathogenicity Islands</i> )
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno ( <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
pb	pares de base
PCD	Morte celular programada ( <i>Programmed Cell Death</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRR	Receptor de reconhecimento do patógeno ( <i>Pathogen Recognition Receptor</i> )
RNA	Ácido ribonucléico
RNAP	RNA polimerase
rpm	Rotações por minuto
rpo	<b>RNA</b> polimerase <i>subunit</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
Sm	Streptomomicina
SSs	Sistemas de Secreção
SST1-7	Sistema de Secreção do tipo 1 ao 7
TAT	translocação de argininas consecutivas
Tc	Tetraciclina
TEMED	(N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina)
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
U	Unidade enzimática
UFC	unidade formadoras de colônias
V	Volts
MW	Marcador de massa molecular (Weight Marker)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
$\sigma^{54}$	Fator sigma alternativo da RNA polimerase de procariotos
$\sigma^{70}$	Fator sigma 70 da RNA polimerase de procariotos
$\sigma$ RNAP	Holoenzima RNA polimerase
% p/v	Relação em porcentagem entre o peso do soluto e o volume da solução
$\mu$ g	micro grama
$\mu$ m	micrometro
$\mu$ M	micro molar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
2.1	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA	17
2.2	SISTEMAS DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS	20
2.3	SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III	26
2.4	FATOR SIGMA HrpL	34
2.5	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	36
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
4.1	BACTÉRIAS	43
4.2	PLASMÍDEOS	46
4.3	DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	47
4.4	LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA E VETORES	48
4.5	ELETROFORESE DE DNA	48
4.6	PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	49
4.7	TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEO PARA ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> POR CONJUGAÇÃO	50
4.8	PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	50
4.9	EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO	52
4.10	AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR	52
4.11	OBTENÇÃO DE DNA MOLDE, A PARTIR DE CULTURA, PARA REAÇÃO DE PCR	53

4.12	SUBCLONAGEM DOS PROMOTORES HrpL-DEPENDENTES. ....	53
4.13	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO .....	54
4.14	CONDIÇÕES DE INDUÇÃO PARA TESTAR A ATIVIDADE DOS PROMOTORES HrpL-DEPENDENTES.....	54
4.15	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE $\beta$ -GALACTOSIDASE. ....	56
4.16	DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	56
4.17	ENSAIO DE ADESÃO E COLONIZAÇÃO .....	57
4.18	ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES .....	58
4.19	CONDIÇÕES DE PLANTIO E CULTIVOS DE PLANTAS DE TOMATEIRO ( <i>Lycopersicon esculentum</i> cv Micro-Tom).....	59
4.20	INFILTRAÇÃO DE FOLHAS DE TOMATEIRO MICRO-TOM .....	60
4.21	OBTENÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE MK1 DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i> .....	61
4.22	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS- PAGE) .....	62
4.23	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HrpL DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> DH10B 64	
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
5.1	CONFIRMAÇÃO DO MUTANTE MK1 (SmR1 <i>hrpL</i> <sup>-</sup> ) .....	65
5.2	SUBCLONAGEM DAS REGIÕES PROMOTORAS <i>hrp-box</i> . ....	68
5.3	EXPRESSÃO DOS PROMOTORES <i>hrp-box1</i> , <i>hrp-box2</i> e <i>hrp-box3</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE INDUÇÃO EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ....	72
5.4	SUBCLONAGEM DO GENE <i>hrpL</i> E EXPRESSÃO DOS PROMOTORES HrpL-DEPENDENTES EM <i>Escherichia coli</i> . ....	80
5.5	CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>hrpL</i> .....	82
5.6	EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>hrpL</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE INDUÇÃO EM <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	85

5.7	CAPACIDADE DE ADESÃO E COLONIZAÇÃO DAS ESTIRPES SELVAGEM E MUTANTES RAMHN1 ( <i>hrcN</i> ) e MK1 ( <i>hrpL</i> ).	87
5.8	INFILTRAÇÃO DE CULTURAS <i>H. seropedicae</i> , EXPRESSANDO A PROTEÍNA AvrPtoB, NO MODELO VEGETAL TOMATE CV MICRO-TOM.	91
6	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	96

## 1 INTRODUÇÃO

Muitas bactérias que colonizam plantas dependem de uma maquinaria especializada para a secreção de proteínas, denominada Sistema de Secreção do tipo III (SST3), para interagir com seus hospedeiros. Bactérias que possuem este sistema podem se associar com o hospedeiro eucariótico simbioticamente ou causando doenças (COLLMER *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2006).

O organismo de estudo deste trabalho é a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986), um diazotrofo endofítico, pertencente ao grupo das  $\beta$ -proteobactérias encontrado no interior de gramíneas, como trigo (*Triticum aestivum*), milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (PIMENTEL *et al.*, 1991; BALDANI *et al.*, 1992b; BODDEY *et al.*, 1995), em algumas espécies de gramíneas forrageiras, bananeiras (*Musa* sp.), palmeiras oleaginosas e abacaxizeiros (*Ananas comosus*) (CRUZ *et al.*, 2001). *H. seropedicae* é capaz de colonizar raízes, caules e folhas de seus hospedeiros sem causar danos à planta hospedeira (OLIVARES *et al.* 1996; JAMES & OLIVARES, 1998).

O sistema de secreção do tipo III é uma maquinaria especializada, presente em muitas bactérias gram-negativas, incluindo importantes patógenos animais dos gêneros *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia*, e fitopatógenos dos gêneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas* e *Ralstonia*. Este sistema é utilizado para o transporte de proteínas efetoras diretamente para o interior de células do hospedeiro eucariótico (HUECK, 1998; GALÁN & COLLMER, 1999; COLLMER *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2006). Este sistema é codificado por um grupo de aproximadamente 20 genes de resposta hipersensitiva e patogenicidade, denominados genes *hrp/hrc*. Apesar do sistema de secreção de proteínas do tipo III ter papel essencial na virulência de muitas proteobactérias patogênicas, ele também está presente em bactérias não patogênicas que se associam simbioticamente a plantas como, por exemplo, *Bradyrhizobium* (GÖTTFERT *et al.*, 2001), *Rhizobium* (FREIBERG *et al.*, 1997) e *Mesorhizobium* (KANEKO *et al.*, 2000). O programa GENOPAR sequenciou o genoma de *H. seropedicae*, e análises de sequências genômicas mostraram a

presença de genes homólogos aos do sistema de secreção do tipo III, sugerindo que este sistema esteja presente nesta bactéria e que possa estar envolvido no processo de interação entre *H. seropedicae* e a planta hospedeira (Programa GENOPAR; DEDECEK, 2006).

Neste trabalho, foram analisados os padrões de expressão de genes *hrp/hrc* que codificam proteínas do sistema de secreção do tipo três (SST3) de *Herbaspirillum seropedicae* através da análise de três prováveis promotores HrpL-dependentes identificados a montante e a jusante dos genes *hrp* de *H. seropedicae*. Os resultados deverão contribuir para a compreensão do mecanismo de regulação deste sistema de secreção em *H. seropedicae* e o seu papel no processo de interação entre planta e bactéria.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Muitos microrganismos vivem em associação com plantas hospedeiras e se beneficiam obtendo carbono e outros nutrientes do hospedeiro.

Essa associação entre planta e bactéria pode ser do tipo colonização epifítica, onde os microrganismos ficam na superfície da planta, ou endofítica quando entram nos tecidos internos das plantas. As bactérias, especialmente *Pseudomonas spp.* e *Erwinia (Pantoea) spp.*, são os microrganismos mais abundantes da filosfera, porção aérea das plantas (ANDREWS & HARRIS, 2000; HIRANO & UPPER, 2000). A rizosfera, onde geralmente há mais proteção contra dessecação, temperatura e estresse luminoso que a filosfera, também é muito colonizada por microrganismos. Além disso, fontes de carbono e minerais são mais abundantes na rizosfera (BOLTON *et al.*, 1992).

Existem pelo menos três tipos de interação planta-bactéria: simbiótica, fitopatogênica e associativa (BRENCIC & WINANS, 2005). Na simbiótica, microrganismo e hospedeiro são beneficiados. Um exemplo importante deste tipo de interação é a simbiose entre leguminosas e rizóbios, em que há estabelecimento de um nódulo na raiz contendo bacteróides fixadores de nitrogênio os quais transferem parte da amônia produzida para a planta e, em troca, obtém proteção e nutrientes da planta (BRENCIC & WINANS, 2005). Na interação fitopatogênica, o microrganismo explora o hospedeiro causando danos e, eventualmente, sua morte. Um exemplo de interação fitopatogênica seria a da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e tomateiro, onde ocorre infecção e permanência da bactéria na planta causando a doença conhecida como mancha bacteriana (NOËL *et al.*, 2002). Nas interações associativas, o microrganismo é aparentemente mais favorecido, mas não causa danos à planta associada. A bactéria pode obter nutrientes do exudato ou mesmo se instalar no interior da planta, e em troca protege a planta suprimindo patógenos ou estimulando o crescimento vegetal através da produção de substâncias específicas (PUHLER *et al.*, 2004).

Segundo alguns autores, pequenas diferenças separam patógenos de simbioses (DJORDJEVIC *et al.*, 1987). Análises transcricionais em *Lotus japonicus* (DEGUCHI *et al.*, 2007) e *Medicago truncatula* (LOHAR, 2006) sugerem que a expressão de genes, relacionados à defesa da planta, podem ser inicialmente expressos após a inoculação com *Rhizobium*. Entretanto, os níveis de expressão podem declinar quando ocorre o desenvolvimento de nódulos. Uma teoria tenta explicar essa relação simbiótica. Considerando que, certos genes relacionados a defesa das bactérias podem ter coevoluído com a simbiose para prevenir o contra-ataque das plantas (JONES & DANGL, 2006).

As plantas exsudam altos níveis de nutrientes, os quais podem agir como quimioatraentes para as bactérias. Durante a interação, a bactéria monitora continuamente as mudanças na fisiologia do seu hospedeiro. Estas mudanças são frequentes devido às atividades específicas da colonização bacteriana, que em resposta faz ajustes a sua própria fisiologia (BRENCIC & WINANS, 2005).

Como as plantas são sésseis e não têm células circulatórias, elas desenvolveram uma resposta imune que pode agir localmente, atingindo algumas células ou, sistemicamente, alcançando muitos metros, como no caso das árvores (JONES & DANGL, 2006). Um dos componentes deste sistema imune são receptores transmembrana chamados PRR (PRR - *Pathogen Recognition Receptor*), que respondem a padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPS - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Um exemplo de molécula PAMPs são as proteínas do flagelo. Essas moléculas são importantes para a sobrevivência do microrganismo e contêm uma estrutura conservada que é reconhecida pelos receptores PRR. Na fase um da resposta imune, os PRRs reconhecem as moléculas PAMPs, resultando na chamada resposta imune mediada por PAMPs, que pode parar ou restringir a colonização. No entanto, agentes patogênicos bem-sucedidos possuem efetores que os permitem ultrapassar esta primeira fase da resposta imune e desencadear uma suscetibilidade mediada por efetores, que compreende a fase dois. Após a segunda fase, ainda é possível que as proteínas efetoras das bactérias sejam reconhecidas por proteínas NB-LRR (*Nuclear-Binding and Leucine-Rich Repeat*), que são codificadas por genes R de resistência da planta e reconhecem os efetores do patógeno ativando o terceiro sistema de defesa da planta. Na fase três,

a resposta contra o invasor é mais rápida e normalmente resulta em uma resposta hipersensitiva, causando morte celular localizada e então resistência à doença.

Pequenas moléculas, tais como toxinas, hormônios e autoindutores e exopolissacarídeos (EPS), podem ser usados pelas bactérias para promover doença. Por exemplo, muitos fitopatógenos secretam quantidades significativas de EPS, polímeros de carboidratos de alta massa molecular, os quais podem entupir o xilema e causar o murchamento da planta. Em plantas resistentes há ocorrência de morte celular programada (PCD – *Programmed cell death*), que é mediada por proteínas de resistência da planta que reconhecem as proteínas de virulência. A morte celular é rápida, tipicamente microscópica e localizada perto do sítio de reconhecimento, matando tanto a célula do hospedeiro como do patógeno, impedindo sua dispersão, esta morte celular é chamada de resposta de hipersensibilidade ou HR (BAUMGARTH *et al.*, 2005). Já a morte celular, associada à doença, é visível, macroscópica, gera sintomas característicos na planta e o patógeno pode se disseminar aumentando sua quantidade em cerca de 100 a 10 000 vezes (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006).

Os grupos das proteobactérias e actinobactérias têm recebido grande atenção, pois são capazes de infectar diversas plantas de variedades cultiváveis, por isso são potenciais causadores de problemas econômicos. Os membros destes grupos têm sido extensivamente estudados. Alguns deles são: *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006). Estes patógenos são dispersos pelo vento, chuva, insetos e práticas de cultivo, e são capazes de entrar nos tecidos das plantas por machucados ou através de aberturas naturais, como lenticelas, hidatódios ou estômatos, alojando-se nos espaços intercelulares (apoplasto) de vários tecidos. Fitopatógenos membros do grupo das proteobactérias causam diversos sintomas, como manchas, ressecamento, murchamento e cancrios, e podem ocasionar morte celular nas raízes, folhas, flores, frutos, sementes e tubérculos. Estes sintomas afetam a produtividade e a qualidade das culturas agrícolas, sendo assim a fitopatogenicidade pode causar sérios danos econômicos e sociais (BROWN, 2001). O controle das doenças bacterianas é parcialmente efetivo e consiste em pulverização com solução contendo cobre, antibióticos, estratégias de biocontrole, remoção em larga escala de plantas infectadas e, o mais importante, a resistência genética do hospedeiro

(ABRAMOVITCH *et al.*, 2006). Deste modo, pesquisas envolvendo as doenças bacterianas em plantas contribuem para elucidar os aspectos fundamentais da patogenicidade microbiana e da resposta associada ao hospedeiro bem como o desenvolvimento de métodos de controle de doenças mais efetivos e sustentáveis (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006).

Análises genéticas dos fatores de virulência microbianos têm mostrado que muitos microrganismos que interagem com plantas possuem genes específicos de patogenicidade, normalmente organizados nas chamadas ilhas de patogenicidade, agrupamento de genes que aparentemente foram adquiridos durante a evolução via transferência horizontal (HUECK, 1998). Isso tem sido particularmente aparente para um grupo de aproximadamente 20 genes que, juntos, codificam o sistema de secreção do tipo três. Este sistema permite que bactérias gram-negativas secretem proteínas diretamente no interior do citosol de células de hospedeiros eucarióticos (HUECK, 1998).

## 2.2 SISTEMAS DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS

A secreção de proteínas é essencial para o sucesso das bactérias patogênicas. As bactérias utilizam estas proteínas para aderirem-se e degradar a parede celular das plantas, suprimir sua resposta de defesa e liberar DNA e/ou proteínas bacterianas diretamente no citoplasma da célula eucariótica (DEAKIN & BROUGHTON, 2009).

O envelope celular de bactérias gram-negativas contém duas membranas: a membrana interna citoplasmática e a membrana externa. A membrana externa e a camada de peptidoglicanos adjacente a ela constituem a parede celular. O espaço entre a parede celular e a membrana citoplasmática é denominado periplasma (DECAD & NIKAIDO, 1976). Portanto, para serem secretadas, as proteínas necessitam atravessar a membrana interna, o periplasma e a parede celular (THANASSI & HULTGREN, 2000).

Diferentes bactérias injetam proteínas chamadas efetoras diretamente nas células da plantas. Sistemas de secreção de proteínas, como o sistema de secreção do tipo três, derivado dos flagelos, ou o sistema de secreção do tipo quatro, derivado

do aparato de conjugação, conduzem estes efetores do citoplasma da bactéria para o citoplasma da célula da planta. A secreção de proteínas é necessária para o desenvolvimento de doenças por fitopatógenos em plantas suscetíveis. Em plantas não suscetíveis, a secreção destas proteínas é necessária para o desenvolvimento da resposta hipersensitiva (HR).

Durante os últimos 20 anos, verificou-se que as bactérias gram-negativas possuíam diversos sistemas de secreção (SSs) (SAIER, 2004; FILLOUX *et al.*, 2008). Sete sistemas foram identificados e denominados sistemas de secreção do tipo I ao tipo VII (SST1 ao SST7) e são usados por patógenos de animais e plantas, sendo que um microrganismo pode possuir mais de um sistema de secreção. Além disso os SSs também são encontrados em organismos não patogênicos. Os SSs variam em complexidade, mas todos usam um polipeptídio único ou um complexo supramacromolecular para construir um caminho através do envelope celular bacteriano (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006).

O sistema de secreção tipo I é um transportador do tipo ABC constituído por: uma proteína de membrana externa, um transportador tipo ABC na membrana interna e uma proteína de fusão da membrana periplasmática (GERLACH & HENSEL, 2007). Este sistema transporta proteínas através das duas membranas em um único passo sem intermediários periplasmáticos e está normalmente relacionado à secreção de diferentes toxinas, proteases e lípases. Seus substratos variam desde proteínas relativamente pequenas (19 kDa) até complexos protéicos com massa molecular de aproximadamente 800 kDa (HOLLAND *et al.*, 2005). O modelo de estudo do SST1 é a secreção da  $\alpha$ -hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli* (WELCH *et al.*, 1981). Em *E. coli* o transportador ABC interage com a proteína de fusão antes da ligação da proteína efetora. A secreção inicia quando o sinal de secreção localizado na porção C-terminal da proteína efetora interage com o transportador ABC, então, este transportador interage com a proteína da membrana externa permitindo a secreção da proteína efetora para o exterior da célula (HENDERSON *et al.*, 2004).

No sistema de secreção do tipo II, as proteínas são transportadas inicialmente para o periplasma pelo mecanismo geral de exportação, também chamado de caminho dependente de Sec, pois utiliza proteínas denominadas Sec. As proteínas que utilizam este mecanismo geralmente tem sinais de exportação (PRESTON *et al.*, 2005). Uma vez no periplasma, as proteínas atravessam a membrana externa

utilizando o SST2, o qual é essencial para aquelas bactérias que invadem as raízes e causam o sintoma de podridão-mole, característico dos organismos do gênero *Erwinia* (JHA *et al.*, 2005). Utilizando um processo de dois passos, este sistema exporta enzimas que estão envolvidas na degradação da parede celular da planta, incluindo pectinases, endoglucanases e celulasas. O SST2 é amplamente conservado em bactérias gram-negativas e é composto por um complexo de 12 a 16 proteínas, denominadas GspC-M, GspA, GspB, GspN, GspO e GspS (JHA, *et al.* 2005).

O sistema de secreção do tipo III é uma maquinaria especializada, utilizada para a secreção e transporte de proteínas efetoras diretamente para dentro da célula de um hospedeiro eucarioto (TANG *et al.*, 2006). O SST3 já foi identificado em mais de 20 patógenos de animais e plantas e em organismos não patogênicos. Apesar do alto grau de conservação entre os componentes deste sistema em diferentes espécies, cada bactéria possui um repertório de proteínas efetoras característico com uma variedade de funções em células animais ou vegetais (GAUTHIER *et al.*, 2003). Este sistema será detalhado no item 2.3.

O sistema de secreção do tipo IV evoluiu provavelmente do sistema de conjugação bacteriano (DEAKIN & BROUGHTON, 2009). Este sistema intermedia o tráfico de proteínas e/ou DNA para o interior da célula vegetal, com gasto de ATP, através de um único passo de translocação (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006). O SST4 possui duas subfamílias, a primeira compreende a maquinaria de conjugação, sendo responsável por transmitir os genes de resistência a antibiótico e outras características entre as bactérias. A segunda, dos translocadores de efetores, é utilizada por muitas bactérias patogênicas para entregar proteínas efetoras e outras moléculas para as células eucarióticas alvo, contribuindo para a colonização dos tecidos do hospedeiro. Este sistema é formado, em geral, por três estruturas distintas: uma proteína acopladora homomultimérica (receptora de substrato), um canal de translocação e um filamento na superfície extracelular (*pilus* de conjugação ou de transferência). Tanto o sistema de translocação de efetores como o de conjugação podem reconhecer as porções C-terminal e motivos internos dos substrato secretados (DEAKIN & BROUGHTON, 2009).

O sistema de secreção do tipo V talvez seja o mecanismo mais simples entre os sistemas de secreção de proteínas. Por não haver energia acoplada à

translocação nem necessidade de proteínas acessórias este sistema é também chamado autotransporte. As famílias de proteínas secretadas por este sistema classificam-se como: (i) secretadas pelo sistema de autotransporte (tipo Va ou AT-1), (ii) secretadas pelo tipo dois parceiros – *TPS (two-partner)* (tipo Vb) e (iii) o descrito mais recentemente, sistema tipo Vc de secreção (AT-2). As proteínas secretadas por essas vias são similares em sua estrutura primária e biogênese. Proteínas autotransportadas são sintetizadas como um único polipeptídeo que contém todas as informações necessárias para sua secreção. Estas proteínas são compostas por 3 regiões: (i) peptídeo sinal, localizado na porção N-terminal da proteína, o qual permite a ligação da proteína com a membrana externa de onde será exportada para o periplasma; (ii) domínio de passagem, o qual confere diversas funções efectoras aos autotransportados; (iii) unidade de translocação, localizada na porção C-terminal formando um barril tipo  $\beta$  com uma estrutura de 10-18 folhas antiparalelas, que facilita a translocação do domínio de passagem através da membrana (HENDERSON *et al.*, 2004). A diferença entre o sistema do tipo Va e Vb é que no primeiro, o domínio de passagem e a unidade de translocação são produzidos como um único polipeptídeo e no segundo, estas duas estruturas são formadas por proteínas distintas. Já no sistema do tipo Vc a proteína a ser secretada admite uma conformação trimérica e depois, uma de suas regiões (*linker region*) forma o poro de translocação, o protótipo de estudo para este sistema é a secreção da proteína YadA de *Y. pestis* (HOICZYK *et al.*, 2000).

Outras duas vias podem transportar as proteínas após serem liberadas no periplasma, a via da “proteína acessória” e a via chaperona/Usher (THANASSI *et al.*, 1998). A primeira requer uma proteína acessória para secreção, que forma um poro tipo barril  $\beta$  na membrana externa através do qual as proteínas podem ser secretadas (THANASSI & HULTGREN, 2000). Esta via parece ser similar ao autotransporte, exceto que os domínios de passagem e o domínio  $\beta$  estão em proteínas diferentes. Na segunda, a via chaperona/*Usher* é um tipo de sistema dedicado à montagem e secreção de uma ampla faixa de estruturas adesivas de virulência na superfície de bactérias gram-negativas. A secreção por esta via requer apenas dois componentes: uma chaperona periplasmática e uma proteína de membrana externa denominada *Usher* (THANASSI *et al.*, 1998).

O sistema de secreção do tipo VI foi o mais recentemente identificado (PUKATZKI *et al.*, 2009). As bactérias que possuem este sistema são principalmente patógenos humanos, animais ou vegetais, mas vários rizóbios não patogênicos e fixadores de nitrogênio também possuem este sistema (DAS *et al.*, 2000). Muitos dos agentes patogênicos que possuem o SST6 representam uma ameaça grave para a saúde humana, como *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* patogênica, bem como agentes patogênicos oportunistas e emergentes, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda* (PUKATZKI *et al.*, 2009). Os componentes deste sistema são codificados em grupos gênicos que variam sua organização dependendo do microrganismo. Esses grupos foram inicialmente nomeados como IAHP (proteínas homólogas associadas a IcmF) por conterem um gene homólogo ao gene *icmF*, do sistema de secreção do tipo IV de *Legionella pneumophila*. No entanto, mais tarde descobriram outros genes que não tinham nenhuma homologia com outros sistemas de secreção, então estes novos genes poderiam ser os responsáveis por codificar os componentes de uma nova máquina de secreção, do tipo VI (FILLOUX *et al.*, 2008).

Os grupos de genes do SST6 codificam normalmente entre 12 e 25 proteínas, entre as quais apenas DotU e IcmF-like são encontradas em outros sistemas de secreção. ATPases são frequentemente usados pelos sistemas de secreção (SSs) para energizar o processo de transporte. No caso do SST6, um gene que codifica uma proteína homóloga à ClpB é encontrado. Esta proteína pertence a uma classe de ATPases que formam um canal hexamérico através do qual transporta proteínas em um mecanismo dependente de ATP. Os homólogos de ClpB encontrados em um grupo gênico deste sistema foram distinguidos como uma subfamília nomeada ClpV. (FILLOUX *et al.*, 2008). A maioria dos componentes do SST6 estudados até agora não são secretados, mas são necessários para a secreção da proteína Hcp (Hemolisina corregulada) e da proteína G (VgrG) (PUKATZKI *et al.*, 2009). A proteína Hcp é secretada por todas as bactérias que contêm este sistema funcional e tornou-se um indicador da função do SST6 (MOUGOUS, 2006), apesar de o gene que codifica Hcp não ser sempre encontrado em grupos do SST6. A análise cristalográfica de Hcp revelou uma estrutura na forma de anéis hexaméricos (MOUGOUS *et al.*, 2006) que polimerizam facilmente em solução formando tubos. É



possível que estes tubos de Hcp permitam que as proteínas sejam transportadas para fora da célula bacteriana até o espaço extracelular ou até o citosol das células do hospedeiro infectado. Assim, parece que Hcp é um componente estrutural e secretado do SST6 (PUKATZKI *et al.*, 2009). Outras proteínas têm sido descritas como prováveis efetoras do sistema de secreção do tipo seis, dentre elas estão as proteínas RbsB (*ribose-binding protein*) de *Rhizobium leguminosarum*, EvP de *Edwardsiella tarda* e TssM de *Burkholderia mallei* (PUKATZKI *et al.*, 2009).

O sistema de secreção do tipo VII, também conhecido como sistema ESX-1, é responsável pela secreção de proteínas ESX, denominadas ESAT-6 e PCP-10 (SIMEONE *et al.*, 2009). Essas duas proteínas, que formam um complexo heterodimérico, estão entre as mais importantes proteínas envolvidas na interação entre hospedeiro-patógeno de *Mycobacterium tuberculosis* – hospedeiro animal. ESAT-6 e PCP-10 de *Mycobacterium tuberculosis* induzem a resposta imunológica mediada por células T e estão aparentemente localizadas na membrana e/ou no lisado celular do hospedeiro representando importantes fatores de virulência. Sistemas ESX também existem em muitas outras actinobactérias e bactérias gram-positivas. (SIMEONE *et al.*, 2009). Genes presentes na região RD1 (uma região que está presente em todos os organismos virulentos laboratoriais e clínicos das estirpes de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*) estão envolvidos no SST7, entre eles estão aqueles que codificam para a proteína Rv3868, a qual se assemelha a uma ATPase e três outras proteínas citosólicas cujos genes estão a jusante e a montante do gene *esxA*. As proteínas citosólicas formam o complexo secretório ESX-1 ligado à membrana, onde a exportação de proteínas é impulsionada pela hidrólise de ATP.

É importante notar que muitos patógenos utilizam múltiplos mecanismos de secreção de proteínas (PRESTON *et al.*, 2005). Em muitas espécies de *Erwinia*, o sistema de secreção do tipo II e III é necessário para o desenvolvimento da interação patogênica (TOTH & BIRCH, 2005). Em estirpes de *Xanthomonas* são encontrados os genes que codificam para o sistema de secreção do tipo II, III e IV (da SILVA *et al.*, 2002). A presença de sistemas conservados em bactérias que tem efeitos profundamente diferentes nas plantas sugere que pequenas diferenças nos sinais que induzem os sistemas de secreção do tipo III e IV ou os seus efetores

podem levar à simbiose ou ao surgimento de doenças (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006).

### 2.3 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III

O sistema de secreção do tipo III foi identificado pela primeira vez no patógeno *Yersinia spp.*, sendo utilizado para a secreção de proteínas Yop (MICHIELS *et al.*, 1990). Desde esta descoberta, o SST3 foi identificado em diversos agentes patogênicos de mamíferos e plantas incluindo *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* e *Chlamydia trachomatis* (HENDERSON *et al.*, 2004; HUECK, 1998). Uma boa definição para este sistema foi dada por TANG e colaboradores em 2006: O sistema de secreção do tipo três é uma maquinaria especializada, utilizada por muitas bactérias gram-negativas patogênicas de plantas e animais para a secreção e transporte de proteínas efetoras diretamente para dentro da célula de um hospedeiro eucarioto.

O SST3 provavelmente evoluiu da maquinaria flagelar das bactérias (SAIER, 2004), por isso, para alguns autores o SST3 pode ser dividido em duas classes: (i) flagelar e (ii) não-flagelar. O SST3 flagelar refere-se ao anel do corpo basal do flagelo e é responsável por secretar os componentes extracitoplasmáticos do flagelo. O SST3 não-flagelar também chamado de injetossoma bacteriano, transloca proteínas efetoras para o citoplasma das células eucariotas de hospedeiros a fim de promover a patogenicidade ou simbiose (BRUTINEL & YAHR, 2008).

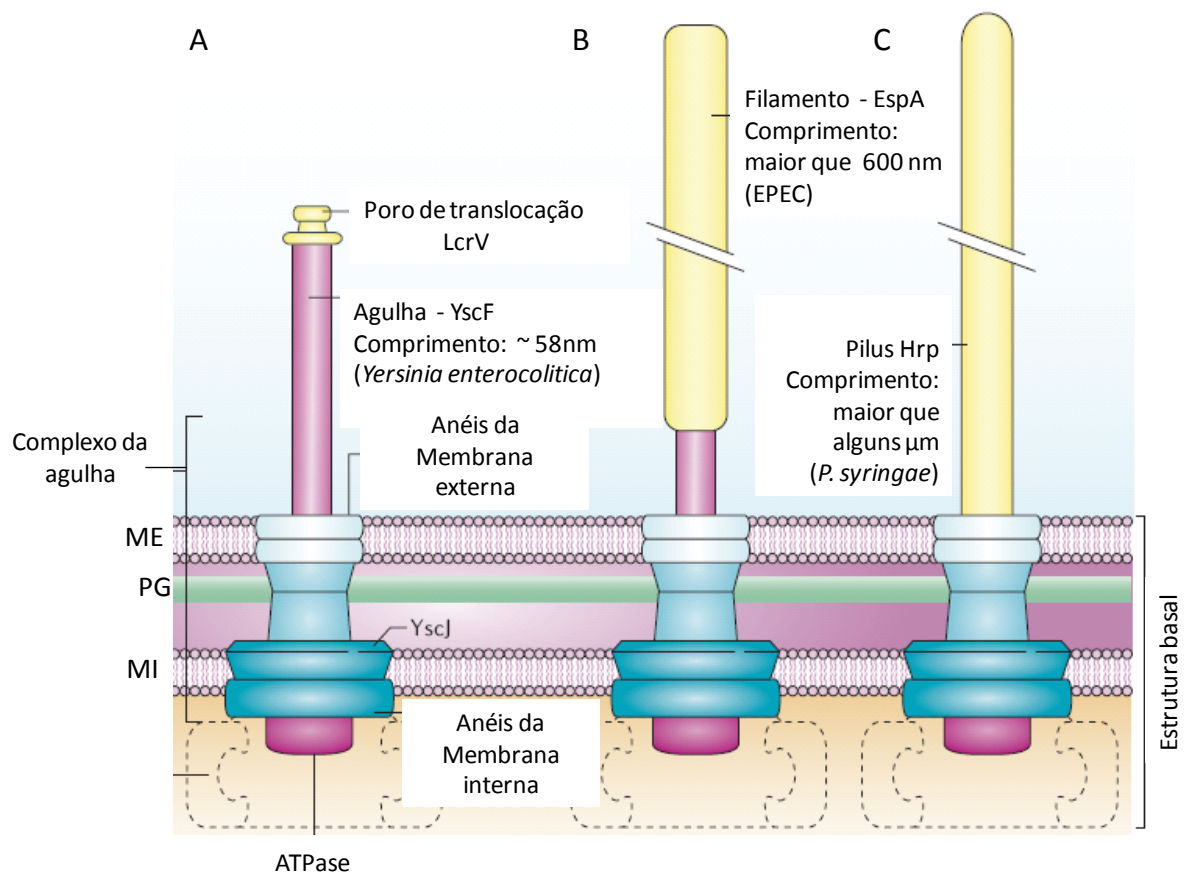
Análises filogenéticas levaram à classificação de sete famílias diferentes de injetossoma bacteriano (GOPHNA *et al.*, 2003; TROISFONTAINES & CORNELIS, 2005). Uma das famílias é limitada ao filo Chlamydiae e outra à ordem Rhizobiales. Os injetossomas que ocorrem mais frequentemente na maioria das bactérias patogênicas de animais englobam três famílias: (i) o injetossoma Ysc de *Yersinia spp* também presente em *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas salmonicida* (ROY-BURMAN *et al.*, 2001; BURR *et al.*, 2003); (ii) na segunda família, cujos membros são distribuídos principalmente entre agentes patogênicos de animais, estão *Shigella flexneri* e *S. typhimurium*; e (iii) na terceira família estão as bactérias

*Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e enterohemorrágica (EHEC). Os injetossomas que ocorrem nos fitopatógenos pertencem a duas famílias diferentes chamadas Hrp1 e Hrp2. É comum para a mesma bactéria patogênica codificar injetossomas de famílias distintas, em que cada um tem um papel em diferentes estágios da infecção, o exemplo mais estudado deste caso é o SST3 de *S. typhimurium* (ZHOU & GALAN, 2001; WATERMAN & HOLDEN, 2003).

O SST3 em geral é formado por uma estrutura cilíndrica chamada de complexo da agulha, semelhante ao corpo basal flagelar, composto por dois pares de anéis que abrangem a membrana bacteriana interna e externa (Figura 1). Dependendo da família de injetossomas uma estrutura de agulha (Figura 1A), um filamento (Figura 1B) ou um *pilus* (Figura 1C) terminam a estrutura (CORNELIS, 2006). A principal diferença entre a agulha, o filamento e o *pilus* é o seu comprimento, sendo que em fitopatógenos o *pilus* é mais comprido, uma vez que os fitopatógenos precisam atravessar a resistente parede celular das células vegetais. Uma das proteínas conservadas do SST3 é uma ATPase, e a integridade desta proteína é essencial para o funcionamento do sistema, uma vez que ela energiza o processo de secreção de proteínas. A ATPase de *P. syringae* forma hexâmeros e dodecâmeros que são ativados por oligomerização e estão periféricamente associados com a parte citoplasmática da membrana interna (POZIDIS *et al.*, 2003).

Estudos recentes de criomicroscopia eletrônica combinada com microscopia eletrônica de transmissão revelaram a estrutura geométrica do corpo basal do SST3 de *Shigella flexneri*, demonstrando sua simetria e a ligação da agulha com o corpo basal por meio de um pistão molecular (ENNINGA & ROSENSHINE, 2009).

Após encontrar a célula eucariótica, o sistema do tipo III executa a translocação de proteínas efetoras bacterianas entre as três membranas (duas bacterianas e uma eucariota) em uma única etapa. Quando a agulha entra em contato com a célula alvo, um poro de translocação na ponta da agulha se insere na membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 1A). A montagem deste poro exige um conjunto de proteínas chamadas translocadoras, que também são substratos do SST3 (CORNELIS, 2006).

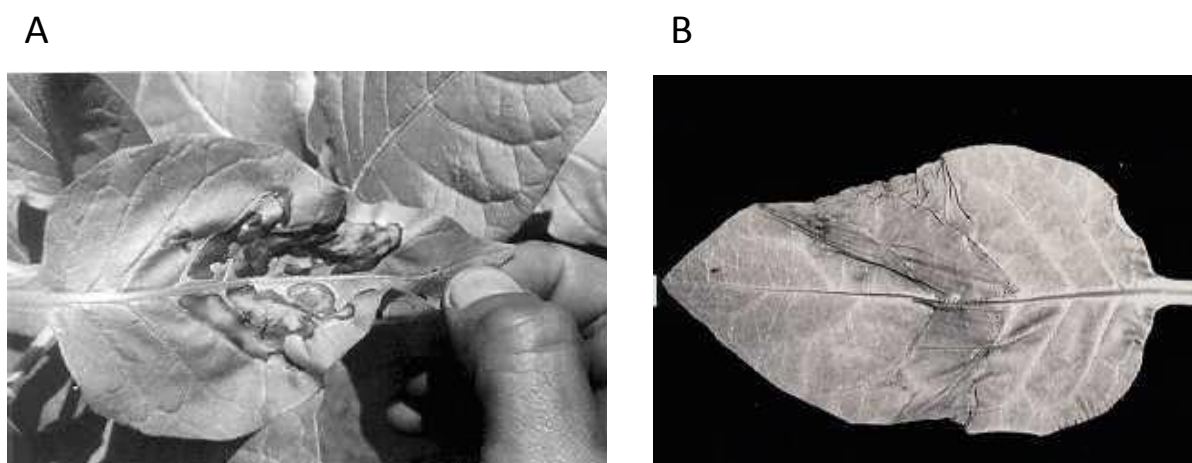


**FIGURA 1: Estrutura esquemática de três famílias de injetossomas bacteriano.**

Esquema da estrutura supramolecular do SST3 de três bactérias diferentes. (a) injetossoma Ysc, de *Yersinia enterocolitica*, mostrando o comprimento da agulha e o poro de translocação que é formado pela proteína translocadora LcrV. (b) injetossoma de EPEC, onde está indicado o comprimento do filamento, o qual é formado pela proteína EspA. (c) injetossoma de bactérias fitopatogênicas, representado pelo SST3 de *P. syringae*, mostrando que o comprimento do *pilus* Hrp é maior do que nas outras famílias de injetossomas. MI=membrana interna, ME=membrana externa e PG=camada de peptidoglicano (CORNELIS, 2006 – adaptado).

Enquanto a secreção de proteínas efetoras é necessária para o desenvolvimento de doenças por fitopatógenos compatíveis nas plantas hospedeiras, em plantas não hospedeiras a secreção destas proteínas é necessária para o desenvolvimento da chamada resposta hipersensitiva (HR) (KEEN, 1990; ALFANO & COLLMER, 1996; BONAS & VAN DEN ACKERVEKEN, 1999). Proteínas bacterianas, chamadas proteínas Avr (*avirulence*), são liberadas para o interior das células da planta via sistema de secreção do tipo III, onde são reconhecidas pelas

proteínas R (*resistance*) da planta e a resposta HR é iniciada (BONAS & VAN DEN ACKERVAKEN, 1997). A HR é uma morte programada da célula vegetal, no local de invasão do patógeno e está relacionada com o mecanismo de defesa da planta. (DANGL *et al.*, 1996). A reação de hipersensibilidade difere, em nível visual, da reação de suscetibilidade (doença), por ser rápida (24 horas ou menos) e localizada (Figura 2). *In vitro*, para a ocorrência de reação de hipersensibilidade, devem ser inoculadas células bacterianas vivas, a planta deve ser não hospedeira, a concentração de inóculo deve ser adequada (igual ou maior que  $10^8$  células/ml) e as condições ambientais devem ser propícias (ROMEIRO & RODRIGUES, 2007).



**FIGURA 2: Reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco.**

**HR exibida por folhas de tabaco depois de infiltradas com suspensão de células de bactérias fitopatogênicas incompatíveis. (A) = *P. fluorescens* (alho); (B) = *P. avenae* (arroz) (ROMEIRO & RODRIGUES, 2007).**

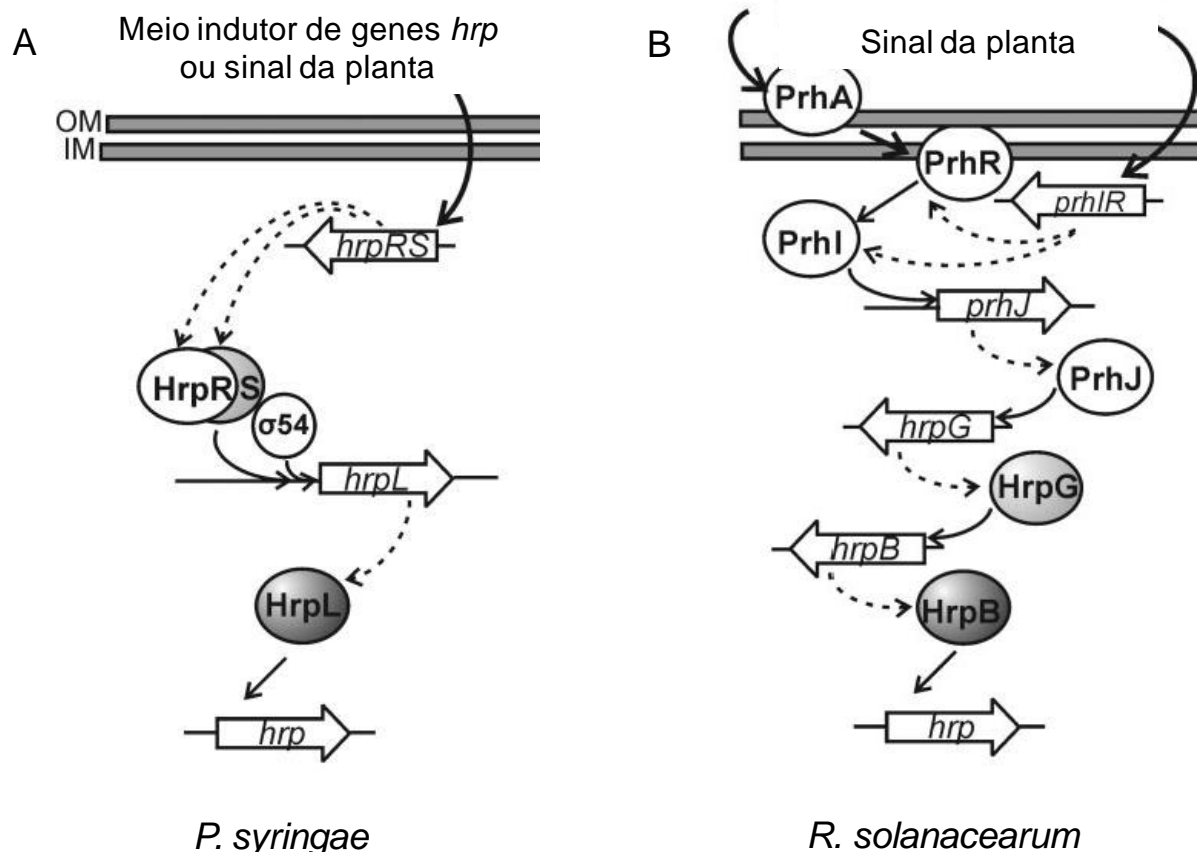
O reconhecimento e direcionamento de proteínas para o aparelho de secreção requer que as proteínas secretadas possuam um sinal de secreção (DEANE *et al.*, 2009). Vários estudos identificaram possíveis sinais de secreção na porção N-terminal de proteínas efetoras, operando tanto no mRNA (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997) como na sequência de peptídeo traduzida (KARAVOLOS *et al.*, 2005). No entanto, o mecanismo de direcionamento específico de substratos ao aparelho de secreção do tipo III ainda é desconhecido (DEANE *et al.*, 2009). Recentemente, vários grupos têm usado diversas técnicas para identificar sinais de secreção desconhecidos dentro da sequência N-terminal de proteínas efetoras (SAMUDRALA *et al.*, 2009). Em *Pseudomonas syringae*, a proteína HrpP (proteína

de controle do comprimento da agulha), mesmo com mutações na porção N-terminal, foi translocada, sugerindo que este substrato possui um sinal de secreção atípico (MORELLO & COLLMER, 2009). Em *Yersinia*, foi demonstrado que esta mesma proteína possui dois sinais independentes de secreção, apenas um deles está na região N-terminal (AGRAIN *et al.*, 2005).

O SST3 é codificado por um grupo de aproximadamente 20 genes *hrp* de resposta hipersensitiva e patogenicidade, os quais estão organizados em vários *operons*, localizados tanto no cromossomo como em plasmídeos de bactérias fitopatogênicas (ARNOLD *et al.*, 2003). A expressão destes genes é regulada por fatores ambientais e do hospedeiro (ARNOLD *et al.*, 2003). Em 1996, BOGDANOVE e colaboradores propuseram uma nomenclatura unificada com base principalmente na homologia entre algumas das proteínas do sistema de secreção do tipo III presentes em patógenos animais e fitopatógenos. Nove genes que codificam para componentes do sistema estrutural do SST3 são amplamente conservados em fitopatógenos e patógenos de animais e foram denominados *hrc* (*hrp conserved*). A última letra do gene corresponde a última letra do gene homólogo em *Yersinia* (BOGDANOVE *et al.*, 1996). O restante dos genes do SST3 são denominados *hrp* e a última letra é utilizada em ordem alfabética conforme a ordem de descobrimento (BOGDANOVE *et al.*, 1996; HUECK, 1998). Em rizóbios, são chamados *rhc* para *Rhizobium conserved* (VIPREY *et al.*, 1998).

Das cerca de 20 proteínas codificadas pelos genes *hrp/hrc*, aproximadamente metade são amplamente conservadas em todos os organismos que utilizam o SST3. Entre estas, encontram-se uma proteína de membrana externa (HrcC), uma lipoproteína associada a membrana interna (HrcJ), cinco proteínas de membrana interna (HrcV, HrcR, HrcS, HrcX, HrcU) e duas proteínas citoplasmáticas (HrpE, HrcN). A proteína citoplasmática HrcN é responsável por fornecer energia à maquinaria de secreção, através da hidrólise de ATP (GAUTHIER *et al.*, 2003).

Os organismos fitopatogênicos que possuem o SST3 podem ser classificados em dois grupos dependendo do mecanismo de regulação da expressão dos genes *hrp/hrc* (Figura 3).

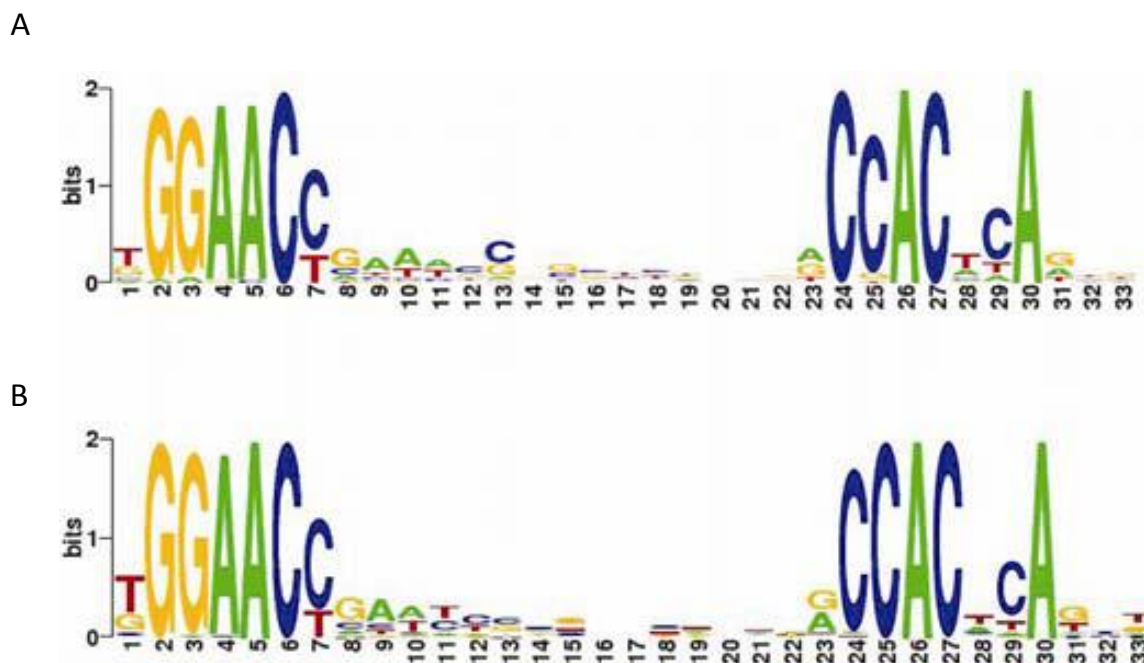


**FIGURA 3: Modelo de regulação dos genes *hrp/hrc* em bactérias fitopatogênicas.**

**Painel A: Cascata de regulação dos genes *hrp* em *Pseudomonas syringae* (grupo I). Painel B: *Ralstonia solanacearum* (grupo II) (BRENCIC & WINANS, 2005 – adaptado).**

Nos organismos do grupo I (*Erwinia* spp., *Pantoea stewartii*, e *Pseudomonas syringae*) (ALFANO & COLLMER, 1997), os genes *hrp/hrc* são regulados pelo fator sigma HrpL, membro da família ECF (função extra-citoplasmática) de fatores sigma alternativos. As proteínas HrpL dessas bactérias são altamente conservadas nas sequências de aminoácidos e reconhecem uma sequência consenso (GGAACC-N15/16-CCACNNA), denominada de “*hrp box*”, nos promotores dos operons *hrp/hrc* estruturais do SST3 e nos promotores de genes codificadores de proteínas efetoras (XIAO *et al.*, 1994; WEI & BEER, 1995; FREDERICK *et al.*, 2001). A sequência consenso do “*hrp box*” tem servido como um importante indicador para a identificação de candidatos a genes efetores do SST3 em bactérias do grupo I (TANG *et al.*, 2006). FERREIRA e colaboradores, em 2006, utilizaram a técnica de microarranjo para identificar todos os promotores *hrp-box* no fitopatógeno modelo *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 e as exaustivas análises bioinformáticas resultaram em

sequências promotoras que confirmam aquelas publicadas por FOUTS e colaboradores (2002) (Figura 4).



**FIGURA 4: Sequências conservadas dos promotores de genes de patogenicidade e resposta hipersensitiva.**

**(A) Sequências obtidas após comparação das regiões promotoras dos genes *hrp* de *P. syringae* expressos durante a interação patogênica com tomateiro. (B) *hrp*-box identificada por FOUTS e colaboradores (2002). (FERREIRA *et al.*, 2006).**

A indução de *hrpL* em *Erwinia* spp. e *Pantoea stewartii* requer o produto de *hrpS*. Já em *P. syringae* requer os produtos de *hrpS* e de *hrpR* (HUTCHESON *et al.*, 2001; MERIGHI *et al.*, 2003). As proteínas HrpR e HrpS pertencem à família NtrC de reguladores de resposta de dois componentes, mas falta o domínio de reconhecimento N-terminal, sugerindo que os reguladores da atividade transcricional de HrpR e HrpS não são regulados diretamente por fosforilação (XIAO *et al.*, 1994). Ambas contêm um domínio semelhante a proteínas ativadoras de transcrição da família NtrC e um motivo que interage com o fator  $\sigma^{54}$ , um fator sigma alternativo da RNA polimerase de procariotos envolvido na integração de metabolismo de nitrogênio e carbono (HUTCHESON *et al.*, 2001; BRETZ *et al.*, 2002). As duas proteínas possuem sequências similares e formam um heterodímero. Acredita-se que a formação do dímero seja crucial para a ativação transcricional do gene *hrpL*.



(HUTCHESON *et al.*, 2001). A proteína HrpS sozinha é capaz de ativar o gene *hrpL* em *P. syringae*, mas somente em um nível muito baixo; e a indução máxima de *hrpL* requer HrpR e HrpS (HENDRICKSON *et al.* 2000; CHATTERJEE *et al.* 2002). Assim, foi sugerido que, sob condições de indução, HrpR e HrpS formam um heterodímero sobre o promotor *hrpL* para estimular a transcrição de *hrpL* pela interação com a holoenzima RpoN-RNA polimerase (HUTCHESON *et al.* 2001). Vários componentes têm sido identificados como sendo responsáveis pela regulação dos genes *hrpR* e *hrpS* de *P. syringae* em diferentes níveis (TANG *et al.*, 2006). Dentre eles, o sistema de dois componentes GacS/GacA, uma vez que o mutante *gacA* de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 apresenta uma redução significativa da transcrição de *hrpRS*, *rpoN* e *hrpL* (CHATTERJEE *et al.*, 2003). GacA é um regulador de resposta e GacS uma histidina quinase, este sistema é encontrado em muitas bactérias servindo como regulador de vários fenótipos bacterianos, como patogenicidade, produção de toxinas e antibióticos, sensoriamento populacional (*quorum sensing*), motilidade, produção de exopolissacarídeos, formação de biofilme e tolerância a estresse (HEEB & HAAS, 2001). No entanto, o mecanismo pelo qual GacA regula a expressão de *hrpRS* e *rpoN* ainda não é conhecido. Além deste sistema, HrpA, um componente do *pilus* Hrp do SST3 foi encontrado afetando a regulação do operon *hrpRS*: em um mutante *hrpA* a transcrição do operon *hrpRS*, *hrpL* e outros genes do SST3 foram severamente reduzidas, e a transcrição foi restaurada com a superexpressão de *hrpRS*. O mecanismo pelo qual HrpA regula *hrpRS* não é claro.

No grupo II, (*Xanthomonas* spp. e *Ralstonia solanacearum*) (ALFANO & COLLMER, 1997) os operons são ativados por um ativador do tipo AraC, o qual é designado HrpB em *R. solanacearum* e HrpX em *Xanthomonas* spp. A expressão destes dois genes é ativada por HrpG, membro da família OmpR de proteínas de sistema de dois componentes, funcionando como um regulador de resposta para permitir a adaptação às mudanças de condições ambientais. Os promotores dos operons *hrp/hrc* e os genes efetores do tipo III regulados por HrpX e HrpB contêm um motivo conservado chamado “*plant inducible promoter (PIP)-box*” (TTTCGC-N15-TTTCGC) em *Xanthomonas* spp. e “*hrpII-box*” (TTTCG-N16-TTTCG) em *R. solanacearum* (KAMDAR *et al.*, 1993; WENGELNIK & BONAS, 1996; BUTTNER & BONAS, 2002; CUNNAC *et al.*, 2004).

O envolvimento de sinais específicos da planta na indução dos genes do SST3 já foram observados. Por exemplo, em *P. syringae* pv. *Phaseolicola*, a indução de *hrpL* foi muito maior em ensaios envolvendo a planta do que a indução em meio de cultura, sugerindo a presença de um sinal derivado da planta hospedeira (RAHME *et al.*, 1992). Certas condições, incluindo temperatura, composição do meio e pH também afetam a expressão de genes *hrp/hrc*. Por exemplo, em *P. syringae*, estes genes são expressos em meio ácido, baixa osmolaridade, limitações de nutrientes e presença de certos açúcares como fonte de carbono (YANG *et al.*, 2008). Essas condições presumivelmente simulam a condição encontrada pelas bactérias durante a infecção. No entanto, os fatores que influenciam a indução do SST3 diferem entre os vários patógenos, o que pode refletir a diferença entre as condições apoplásticas de diferentes espécies hospedeiras (TANG *et al.*, 2006). Assim, embora a indução dos genes *hrp/hrc* possa ser detectada em meio mínimo, a indução máxima de pelo menos alguns genes *hrp/hrc* parece requerer fatores específicos da planta. Isto parece vantajoso, uma vez que a expressão do SST3 é um processo que consome muita energia, e consequentemente beneficiaria as bactérias induzir os genes *hrp/hrc* somente quando em contato próximo com a célula hospedeira (BRENCIC & WINANS, 2005).

## 2.4 FATOR SIGMA HrpL

Fatores sigma ( $\sigma$ ) são proteínas que se associam de forma reversível com a enzima RNA polimerase (RNAP). São proteínas relativamente pequenas (massa molecular de cerca de 28 kDa até aproximadamente 80 kDa) se comparadas com o complexo da RNA polimerase, que tem cerca de 400 kDa. Os fatores sigma são designados pelo símbolo  $\sigma$ , contendo na forma sobrescrita o nome do gene que o codifica, a sua massa molecular ou uma letra arbitrária (WÖSTEN, 1998; PAGET & HELMANN, 2003).

Baseando-se em similaridade de sequências genômicas entre diversos microrganismos, os fatores sigma bacterianos foram agrupados em duas famílias,  $\sigma^{70}$  e  $\sigma^{54}$  (MERRICK *et al.*, 1987; SASSE-DWIGHT & GRALLA, 1990). A maioria dos fatores  $\sigma$  bacterianos pertence à família  $\sigma^{70}$ , que é assim nomeada por esse fator de

*E. coli* (LONETTO *et al.*, 1992) possuir massa molecular de 70 kDa. Muitas bactérias também têm o fator  $\sigma^{54}$  (MERRICK, 1993). Enquanto a família  $\sigma^{54}$  contém apenas um grupo de proteínas, classificadas como não essenciais para certas condições de crescimento, a família  $\sigma^{70}$  pode ser dividida em três diferentes grupos funcionais ou estruturais. O grupo I compreende os fatores  $\sigma$ -primários responsáveis pela transcrição de genes expressos na fase exponencial de crescimento celular e que também são essenciais para a sobrevivência celular. Os fatores  $\sigma^{70}$  do grupo II possuem sequências similares àsquelas de fatores  $\sigma$ -primários, mas não são essenciais para o crescimento celular. O terceiro grupo consiste nos fatores  $\sigma$  alternativos que diferem nas sequências de aminoácidos dos fatores  $\sigma$ -primários e controlam a transcrição de *regulons* específicos (WOËSTEN, 1998).

O início da transcrição é a etapa mais importante para a regulação gênica em bactérias. Para iniciar a transcrição a enzima RNA polimerase deve associar-se a um fator  $\sigma$ . Os diferentes fatores  $\sigma$ , sintetizados por diversas espécies de bactérias, direcionam a RNAP à sequências conservadas na região promotora. Esta variedade de fatores sigma permite à bactéria a expressão basal de genes, bem como a expressão coordenadamente regulada em resposta a alterações ambientais (WOËSTEN, 1998).

A sequência dos elementos promotores é somente um dos fatores que determinam a eficiência de um promotor. A ligação da holoenzima RNA polimerase ao promotor e a transição de complexo fechado para aberto é afetada pela conformação do DNA na região do promotor e por proteínas acessórias (WOËSTEN, 1998). A expressão gênica também depende do superenovelamento do genoma, que é normalmente negativa (DORMAN, 1996). Diferenças no grau de enovelamento existem e podem ser moduladas por sinais ambientais, como temperatura, anaerobiose e osmolaridade. A densidade do DNA superenovelado afeta a flexibilidade no espaçamento da região promotora e assim afeta o início da transcrição de forma positiva ou negativa. Muitas sequências específicas de proteínas ligadoras de DNA são conhecidas por influenciar a atividade promotora. Por exemplo, existem 40 proteínas que podem ativar ou prevenir a transcrição de promotores dependentes do fator  $\sigma^{70}$  em *E. coli* (GRALLA & COLLADO-VIDES, 1996). Estas proteínas permitem que as bactérias regulem a expressão de genes em resposta a estímulos internos e externos. Genes que respondem a um estímulo

comum normalmente usam o mesmo elemento regulatório e são identificados como integrantes de um mesmo *regulon*. Ativadores desses promotores normalmente se ligam ao DNA entre as posições -30 e -80 do sítio de início da transcrição. Repressores se ligam preferencialmente a locais que sobrepõe o sítio de ligação da polimerase (GRALLA & COLLADO-VIDES, 1996). As proteínas tipo histona de *E. coli* podem inibir o início da transcrição por se ligar a qualquer lugar no DNA. A metilação do DNA também pode ser um impedimento para a ligação da RNAP e consequentemente para o início da transcrição (WOËSTEN, 1998).

Sabe-se que a regulação da expressão do sistema de secreção do tipo III em muitas bactérias patogênicas e principalmente em *Pseudomonas syringae* é dependente do fator  $\sigma$  alternativo do tipo-ECF, da família  $\sigma^{70}$  (*extracytoplasmic function*), HrpL. O fator sigma HrpL possui alta similaridade com AlgU, um fator sigma alternativo que controla a biossíntese de polissacarídeos extracelulares em *P. aeruginosa* (XIAO, 1994). A identidade entre os motivos de ligação de DNA destas duas proteínas sugere que elas reconheçam sequências promotoras parecidas (LONETTO *et al.*, 1992). OHNISHI *et al.* (1990) e LONETTO *et al.* (1992) demonstraram que AlgU e HrpL possuem o mesmo tamanho e sua similaridade permitiu a inclusão de HrpL no grupo III de fatores sigma 70. A identificação de promotores e genes de resposta hipersensitiva e patogenicidade, dependentes do fator sigma alternativo HrpL, é uma etapa chave para o entendimento do mecanismo de regulação dos microrganismos que possuem esta proteína (XIAO *et al.*, 1994).

## 2.5 *Herbaspirillum seropedicae*

### 2.5.1 *H. seropedicae* e a fixação de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para a sobrevivência de todos os organismos, sendo necessário para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas. Ele é abundante no ar atmosférico (aproximadamente 80%) na forma de nitrogênio molecular ( $N_2$ ), mas somente certas bactérias fixadoras de nitrogênio e certas arqueas são capazes de transformar o  $N_2$  atmosférico em  $NH_3$  ou aminoácidos que podem ser utilizados pelas plantas e animais (DÖBEREINER &

PEDROSA, 1987). Este processo de redução de  $N_2$  a  $NH_3$  é denominado fixação de nitrogênio. A fixação biológica de nitrogênio é uma parte importante do ciclo do nitrogênio porque recupera o nitrogênio fixado da biosfera, compensando as perdas devido à denitrificação.

A disponibilidade de nitrogênio fixado é frequentemente o fator limitante para a produtividade agrícola (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). Por outro lado, a utilização de fertilizantes químicos nitrogenados é causa de emissões aumentadas de óxidos do nitrogênio, acidificação do solo e da eutrofização da água (DIXON & KAHN, 2004). Atualmente, existe uma preocupação em empregar métodos ecologicamente sustentáveis, por isso a fixação biológica de nitrogênio tem recebido mais atenção.

O gênero *Herbaspirillum* pertence às  $\beta$ -proteobactérias, que também agrupa muitas bactérias que se associam a plantas, como aquelas dos gêneros *Azoarcus*, *Burkholderia* e *Ralstonia* (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.* 1992a).

*H. seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, geralmente vibrióide, algumas vezes helicoidal e móvel. Apresenta 0,6 a 0,7  $\mu m$  de diâmetro, 1,5 a 5  $\mu m$  de comprimento e possui de um a três flagelos em um ou ambos os pólos. É um microrganismo capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI *et al.*, 1986). Este microrganismo foi, primeiramente, isolado no município de Seropédica, Rio de Janeiro (Brasil), de tecidos internos de raízes de milho, sorgo e arroz cultivados em dois solos diferentes. Posteriormente, foi também encontrado em plantas de milho crescidas em solos de cerrado na região de Brasília-DF (BALDANI *et al.*, 1986). Cruz e colaboradores, em 2001, também identificaram esta bactéria, através da caracterização do gene 16sRNA de isolados de colmo, folhas, raízes e frutos de abacaxi (*Ananas comosus*) e banana (*Musa* sp.) em cultivares do estado da Bahia e Rio de Janeiro. Esta bactéria é capaz de colonizar raízes, caules e folhas de seus hospedeiros sem causar doença e apresenta baixa sobrevivência no solo (OLIVARES *et al.* 1996; JAMES & OLIVARES, 1998).

O processo de colonização por *H. seropedicae* ocorre através da ligação da bactéria à superfície da planta. A entrada da bactéria ocorre nos pontos de emergência de raízes secundárias e ferimentos, e a disseminação ocorre através dos espaços intercelulares com posterior ocupação do xilema (RONCATO-

MACCARI, 2003b; JAMES *et al.*, 2002; OLIVARES & BALDANI, 1995 e BALDANI *et al.*, 1992b).

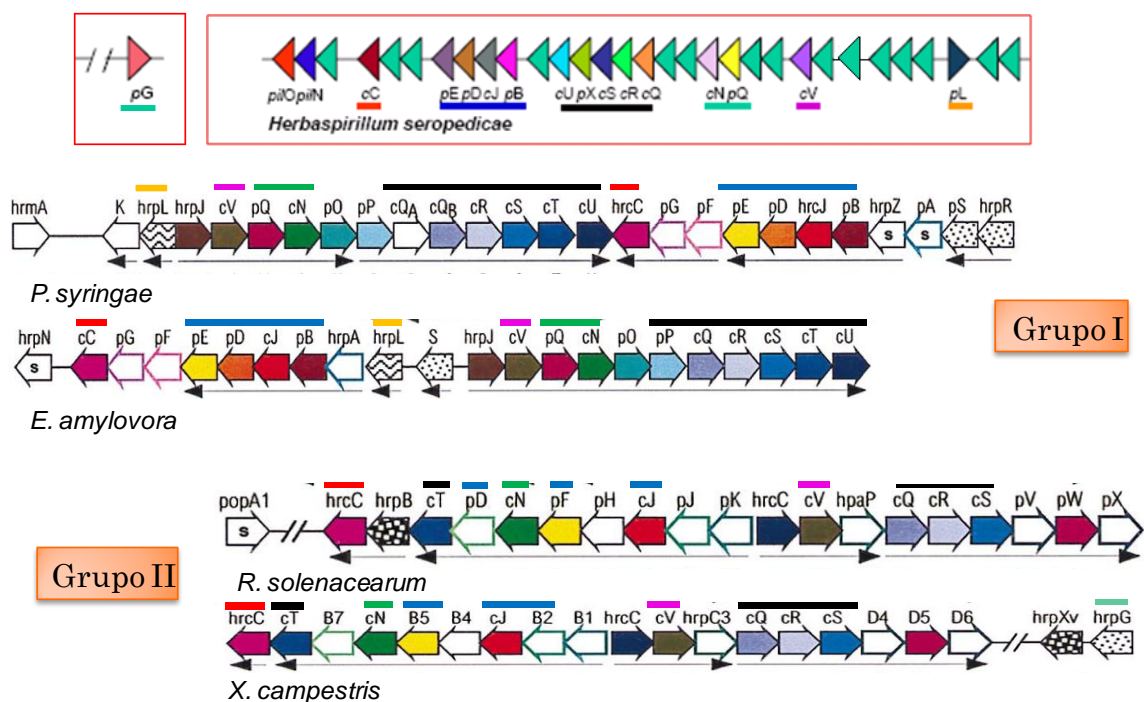
A capacidade de *H. seropedicae* formar uma associação com gramíneas de interesse econômico, sem provocar doença, tem despertado interesse para seu estudo. Vários trabalhos demonstraram que essa interação pode trazer benefícios à planta. BALDANI e colaboradores (2000) e RONCATO-MACCARI e colaboradores (2003a) observaram que a inoculação de arroz com esta bactéria promove um aumento de conteúdo de nitrogênio em grãos e aumento de crescimento de raízes. Estes resultados indicam que *H. seropedicae* tem potencial como biofertilizante (DÖBEREINER, 1992; PEDROSA *et al.*, 2001).

#### 2.5.2 Sistema de secreção do tipo III de *H. seropedicae*

Na última década, pesquisas sobre a evolução e função do sistema de secreção do tipo III em *Salmonella* e *Yersinia* chegaram à conclusão de que os genes associados com a patogenicidade, como os que codificam para o SST3, estão normalmente em grupos transferidos horizontalmente chamados “ilhas de patogenicidade” (PAIs) (GROISMAN & OCHMAN, 1996; HACKER *et al.*, 1997).

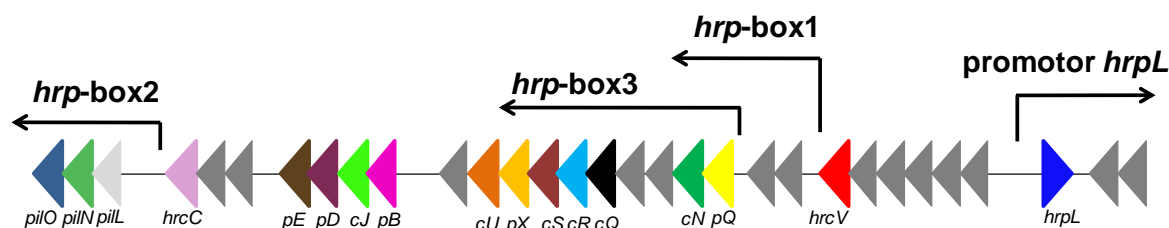
A análise de sequências genômicas de *H. seropedicae*, realizada pelo Programa Genoma do Paraná (GENOPAR), revelou uma região de aproximadamente 28 kb contendo 14 genes com produtos similares a proteínas Hrp/Hrc de organismos fitopatogênicos que compõem o sistema de secreção do tipo III (Figura 5). Em outra região do genoma foi encontrado um gene homólogo a *hrpG*, cujo produto pode ser o provável regulador da expressão dos genes do sistema secreção de *H. seropedicae*. Esta região de 28 kb possui um conteúdo de C+G semelhante ao restante do genoma e ausência de elementos de transposição (DEDECEK, 2006). Usualmente, as ilhas de patogenicidade apresentam um conteúdo de C+G diferentes do restante do genoma (HACKER & KAPER, 2000; HACKER *et al.* 1997) e elementos de transposição ou de mobilidade e genes codificadores de RNA transportadores localizados adjacentes à ilha (HACKER & KAPER, 2000; HOU, 1999). A falta destas características na região do SST3 de *H. seropedicae* sugere que a aquisição deste grupo de genes é remota.

Baseado nas sequências consenso altamente conservadas reconhecidas pelas proteínas HrpL (*hrp box*), três regiões foram identificadas como sendo reguladas por promotores do tipo *hrp-box*. Estes promotores foram denominados *hrp-box1*, *hrp-box2* e *hrp-box3* (Souza, E.M., não publicado) (Figura 6). A identificação destes promotores indica a presença de genes similares aos do sistema de secreção do tipo III, sugerindo que este sistema esteja presente nesta bactéria e que possa estar envolvido no processo de interação entre *Herbaspirillum seropedicae* e a planta associada.



**FIGURA 5: Comparação da organização dos genes *hrp/hrc* de *Herbaspirillum seropedicae*, *P. syringae*, *E. amylovora*, *R. solanacearum* e *X. campestris*.**

**Em *H. seropedicae* os genes *hrpL* e *hrpG* provavelmente são responsáveis pela regulação do sistema *hrp/hrc*. As barras coloridas indicam a localização de alguns genes presentes nos cinco organismos (adaptado de HUECK (1998) e DECECEK (2006)).**



**FIGURA 6:** Provável organização transcricional dos operons do grupo de genes *hrp/hrc* de *Herbaspirillum seropedicae* (GENOPAR).

Análises *in silico* feitas por DEDECEK (2006) sobre os produtos dos genes *hrp/hrc* identificados no genoma do *H. seropedicae* sugeriram as prováveis funções de alguns destes no sistema de secreção do tipo III. Entre as proteínas codificadas por estes genes, foi identificada a proteína formadora do poro da membrana externa HrcC e a proteína formadora do poro da membrana interna HrcV, que apresenta 4 domínios transmembrana e um peptídeo âncora sinal amino-terminal de 20 aminoácidos (LETUNIC *et al.*, 2006). Em *H. seropedicae* a análise da proteína homóloga a HrpL mostrou a presença de dois domínios das proteínas da família sigma 70, r2 (número de acesso SMART PF04542) e r4 (número de acesso SMART PF04545).

Sendo assim, em *H. seropedicae* parece existir um mecanismo único para a regulação da expressão dos genes *hrp*, pois neste organismo a regulação da expressão do SST3 parece ocorrer por um mecanismo híbrido entre as cascatas regulatórias dos grupos I e II, uma vez que um sinal externo parece ativar a expressão de *hrpG*, que, por sua vez, ativa *hrpL*, responsável pela expressão dos genes *hrp*.



### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O sistema de secreção do tipo III é importante na interação de bactérias e hospedeiros vegetais, sendo responsável pela secreção e transporte de proteínas efetoras para o interior de células eucarióticas (HUECK, 1998; GALÁN & COLLMER, 1999). O sequenciamento do genoma de *H. seropedicae* mostrou que esta bactéria possui genes homólogos aos *hrp/hrc* de bactérias fitopatogênicas (DEDECEK, 2006). No entanto, pouco se sabe sobre a função deste sistema em *H. seropedicae*, mas é provável que atue injetando moléculas efetoras nas células vegetais, permitindo a comunicação entre as duas células. Assim, o objetivo geral deste trabalho é contribuir para o esclarecimento da função deste sistema de secreção em *H. seropedicae*, analisando a expressão dos promotores HrpL-dependentes e do promotor do gene *hrpL* e determinar o padrão de adesão e colonização às raízes de plântulas de milho e arroz de um mutante *hrpL*<sup>-</sup> e *hrcN* de *H. seropedicae*.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Subclonar os fragmentos de DNA contendo as regiões promotoras de interesse no vetor de fusão pMP220.

- Subclonar o promotor *hrp*-box1 no vetor de fusão pMP220 para obter fusão *hrp*-box1::*lacZ*.
- Subclonar o promotor *hrp*-box2 no vetor de fusão pMP220 para obter fusão *hrp*-box2::*lacZ*.
- Subclonar o promotor *hrp*-box3 no vetor de fusão pMP220 para obter fusão *hrp*-box3::*lacZ*.
- Amplificar e clonar a região promotora do *operon* que contém o gene *hrpL* nos vetores de fusão pPW452 e pMP220 para obter a fusão *hrpL*intergenic::*lacZ*.

3.1.2 Determinar o padrão de expressão dos promotores HrpL-dependentes em estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem e mutante

MK1 (*hrpL*<sup>-</sup>) utilizando as construções *hrp-box1::lacZ*, *hrp-box2::lacZ*, *hrp-box3::lacZ* e *hrpLintergenic::lacZ*.

- Identificar condições de cultivo capazes de induzir os promotores HrpL-dependentes e realizar ensaios de atividade  $\beta$ -galactosidase.

3.1.3 Testar a capacidade das estirpes SmR1 selvagem e mutantes MK1 (*hrpL*<sup>-</sup>) e RAMHN1 (*hrcN*) de colonizar e aderir às raízes de plântulas de arroz e milho.

3.1.4 Verificar a funcionalidade do sistema de secreção tipo III *in vivo* utilizando o modelo biológico do tomateiro Micro-Tom.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 BACTÉRIAS

As bactérias utilizadas nesse trabalho estão descritas na tabela 1.

TABELA 1: ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae* E *Escherichia coli*

Estirpe	Genótipo ou Fenótipo	Referência/Fonte
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	Sm <sup>R</sup> ; F' [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacZ</i> _M15]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
S17.1	Sm <sup>R</sup> , Tra <sup>+</sup>	SIMON <i>et al.</i> , 1983
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Z78, Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup>	SOUZA <i>et al.</i> , 1995; PEDROSA <i>et al.</i> , 1997
MK1	Estirpe SmR1, <i>hrpL</i> <sup>-</sup> , Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	KADOWAKI, não publicado
RAMHN1	Estirpe SmR1, Sm <sup>R</sup> , <i>hrcN::Tc</i> <sup>R</sup>	CHAVES, 2008

#### 4.1.1 Meios de cultura e condições de cultivo

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios de cultura listados abaixo, sob agitação (150 rpm) ou em meio sólido LA, a 37 °C.

- Luria Bertani líquido ou LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) (5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 10 g/L de triptona).
- Luria Bertani ágar ou LA (meio LB contendo 15 g/L de ágar).
- SOB (GIBCO-INVITROGEN) (5 g/L de extrato de levedura; 0,6 g/L de NaCl; 0,18 g/L de KCl; 20 g/L de triptona).
- SOC (meio SOB contendo 3,6 g/L de glucose; 0,94 g/L de MgCl<sub>2</sub>; 1,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas nos meios listados abaixo. O cultivo em meio líquido foi feito a 30°C, sob agitação (120 rpm). As culturas em meio sólido ou semi-sólido foram incubadas em estufa a 30°C.

- NFb-Malato (KLASSEN *et al.*, 1997) (0,2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g/L NaCl; 0,02 g/L  $\text{CaCl}_2$ ; 0,056 g/L ácido nitrilo-triacético; 0,02 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5 g/L ácido málico; 0,0002 g/L biotina; 0,002 g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,00235 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,0028 g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,00008 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,00024 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). O pH do meio foi acertado para 6,0 pela adição de KOH 3 mol/L. Para o meio sólido foram adicionados 15 g/L de ágar e para o meio semi-sólido, 1,5 g/L. No momento do uso foi adicionado 50 mL/L de solução de fosfatos (17,8g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 159,5g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio. O meio com fosfatos e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  é denominado NFbHPN-Malato.
- NFb-Malato concentrado 3X (DÖBEREINER *et al.*, 1995): meio NFb concentrado 3X contendo 6 ml/L de solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 mol/L de KOH). Este meio foi utilizado para a identificação de colônias de *H. seropedicae* que acumulam o corante.
- XOM1 (KUBO *et al.*, 2002) (20 mmol/L NaCl; 10 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 5 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ ; 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ; 0,16 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,32 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,01 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ ; 0,03% casaminoácidos e fonte de carbono variável conforme a condição de indução; pH 6,7).
- XOM2 (KUBO *et al.*, 2002) (670  $\mu\text{mol/L}$  D,L-metionina; 10 mmol/L glutamato de sódio; 14,7 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 40  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MnSO}_4$ ; 240  $\mu\text{mol/L}$  Fe(III)-EDTA; 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  e fonte de carbono conforme a condição de indução; pH 6,5).

Após o preparo, todos os meios foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C. As soluções de fosfatos e cloreto de amônio utilizadas para cultivo de *H. seropedicae* foram autoclavadas separadamente.

#### 4.1.2 Manutenção de estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram mantidas em suspensão em solução de glicerol 50% a -20 °C ou em placas contendo meio LA e antibióticos a 4°C. As estirpes de *H. seropedicae* foram mantidas a curto prazo em placas contendo meio sólido NFbHPN-Malato ou NFb-Malato 3X contendo solução de azul de bromotimol. Para estocagem por longo período, *H. seropedicae* foi mantido em frascos contendo meio NFbHPN-Malato semi-sólido e antibióticos seletivos, à temperatura ambiente ou suspensas em solução de glicerol 50% a -20 °C.

#### 4.1.3 Antibióticos

Os antibióticos utilizados para seleção de estirpes bacterianas e suas concentrações estão listados na tabela 2:

TABELA 2: ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS

Antibiótico	Concentração final no meio de cultivo (µg/mL)
<i>E. coli</i>	
Ampicilina (Amp)	250
Tetraciclina (Tc)	10
Canamicina (Km)	50
Cloranfenicol (Cm)	30
Estreptomicina (Sm)	20
<i>H. seropedicae</i>	
Estreptomicina (Sm)	80
Canamicina (Km)	200
Tetraciclina (Tc)	10

As soluções estoques dos antibióticos ampicilina, canamicina e estreptomicina foram preparadas em água ultrapura e esterilizadas por filtração (Millipore 0,22 µm). As soluções estoque de tetraciclina foram preparadas em etanol 95%. As soluções de antibióticos foram armazenadas a -20°C.

## 4.2 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 3.

TABELA 3: PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Características	Referência/Fonte
pGEM- <i>Thrp</i> -box1	pGEM <sup>®</sup> -T (Promega) contendo um fragmento de 271 pb com provável região regulatória a jusante do gene <i>hrcV</i> de <i>H. seropedicae</i> .	SOUZA, não publicado
pGEM- <i>Thrp</i> -box2	pGEM <sup>®</sup> -T (Promega) contendo um fragmento de 645 pb com provável região regulatória a jusante do gene <i>hrcC</i> de <i>H. seropedicae</i> .	SOUZA, não publicado
pGEM- <i>Thrp</i> -box3	pGEM <sup>®</sup> -T (Promega) contendo um fragmento de 166 pb com provável região regulatória a montante do gene <i>hrpQ</i> de <i>H. seropedicae</i> .	SOUZA, não publicado
pMP220	Tc <sup>R</sup> , vetor de fusão transcricional <i>lacZ</i> .	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pPW452	Tc <sup>R</sup> , derivado do pMP220 com o sítio de policlonagem invertido.	P. WOODLEY
pMP <i>hrp</i> -box1 e pMP <i>hrp</i> -box1 invertido.	pMP220 contendo um fragmento <i>EcoRI</i> de 271 pb com provável região regulatória a jusante do gene <i>hrcV</i> clonado nas duas orientações.	este trabalho
pMP <i>hrp</i> -box2 e pMP <i>hrp</i> -box2 invertido	pMP220 contendo um fragmento <i>EcoRI</i> de 645 pb com provável região regulatória a jusante do gene <i>hrcC</i> clonado nas duas orientações.	este trabalho
pMP <i>hrp</i> -box3 e pMP <i>hrp</i> -box3 invertido	pMP220 contendo um fragmento <i>EcoRI</i> de 166 pb com provável região regulatória a montante do gene <i>hrpQ</i> clonado nas duas orientações.	este trabalho
pTZ57R/T	Vetor de clonagem TA, <i>LacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	FERMENTAS
pTZ <i>hrp</i> Lintergenic	Contém a região intergênica <i>orf</i>	este trabalho

	<i>hipotética/hrpL</i> de 324 pb referente ao promotor do gene <i>hrpL</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ57R/T	
pMP220 <i>hrpL</i> intergenic	pMP220 contendo a região intergênica <i>orf hipotética/hrpL</i> (324pb) de <i>H. seropedicae</i> clonado PstI/BglII.	este trabalho
pPW452 <i>hrpL</i> intergenic	pPW452 contendo a região intergênica <i>orf hipotética/hrpL</i> (324pb) de <i>H. seropedicae</i> clonado PstI/BglII.	este trabalho
pET29aHrpL	pET29a contendo o gene <i>hrpL</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado sob controle do promotor T7 como fragmento XbaI/HindIII.	SOUZA, não publicado
pDK7	Vetor de expressão, promotor <i>tac</i> , Cm <sup>R</sup> .	KLEINER, 1988
pDK7-HrpL	pDK7 contendo o gene <i>hrpL</i> de <i>H. seropedicae</i> subclonado nos sítios HindIII/XbaI.	este trabalho
pLAFR3.18	Cosmídeo, Tc <sup>R</sup> , IncP, contendo sítio de policlonagem do vetor pTZ18R	MACHADO <i>et al</i> , 1995
pLAFR-PsPto	pLAFR3.18 contendo o gene que codifica para a proteína AvrPto de <i>P. syringae</i> sob controle do promotor <i>lacZ</i> .	SOUZA, não publicado
pDSK519-173	Km <sup>R</sup> , plasmídeo de ampla faixa hospedeira. Contém o gene que codifica para a proteína AvrPtoB de <i>P.syringae</i> sob controle do promotor nativo ( <i>hrp</i> ).	BAUER, D.W. (Cornell University)

#### 4.3 DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.

Uma a cinco unidades de enzimas de restrição (FERMENTAS<sup>®</sup>) foram utilizadas para digestão de 0,2 – 1 µg de DNA em um volume final de 20 µL, durante 4 horas, na presença do tampão recomendado e temperatura adequada. As condições utilizadas para as digestões com enzimas de restrição foram aquelas especificadas pelo fabricante ou por SAMBROOK *et al.*, (1989). O DNA digerido foi

analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7% ou 1% em tampão TBE 1X (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Os vetores utilizados foram clivados com as enzimas de restrição adequadas, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Após a digestão, as enzimas foram desnaturadas por tratamento térmico, como indicado pelo fabricante. O DNA digerido foi precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 70%, seco e dissolvido em água ultrapura (SAMBROOK *et al.*, 1989).

#### 4.4 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA E VETORES

O vetor linearizado e o inserto foram ligados numa razão molar de 1:5. Para a reação foram adicionados tampão de ligação e 0,5 U de T4 DNA ligase. O sistema foi incubado a 16°C durante a noite.

#### 4.5 ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose horizontal como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). O tampão utilizado foi TBE 1X (Tris base 16,2g/L; ácido bórico 2,75g/L; EDTA 0,95g/L; pH 8,0). As amostras foram diluídas em tampão F.E.F Suds (azul de bromofenol 0,025%; xilenocianol 0,025%; SDS 0,1%; Ficoll® 20% em tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>). Após o tempo de corrida, que variou dependendo da voltagem utilizada, o DNA foi tratado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 minutos e foi visualizado sob luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador UV. As imagens foram obtidas utilizando o EC3™ Imagem System - UVP BioImaging Systems.



#### 4.6 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO.

O preparo de células competentes visa alterar a permeabilidade das paredes celulares bacterianas, fazendo com que essas células permitam a entrada do DNA plasmidial através da membrana celular.

##### Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Quatro mililitros de uma cultura fresca crescida em meio LB, a partir de colônia isolada, foram inoculadas em 200mL de meio SOB e incubadas a 37°C sob agitação a 120 rpm até D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,6. Em seguida as culturas foram mantidas no gelo por cerca de 30 minutos. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com 50 mL de água estéril gelada, ressuspensas em 20 mL de glicerol 15%, centrifugadas novamente e ressuspensas em 1 mL de glicerol 15%. As células foram usadas no mesmo dia ou aliqüotadas (100µl) e armazenadas a -70 °C. Todas as etapas de centrifugação foram feitas a 5.000rpm durante 5 minutos (4°C). As células foram mantidas em gelo durante todo o processo.

O método utilizado para transformação bacteriana foi o descrito pelo fabricante (Gibco-BRL-Invitrogen). Para eletroporação, 100 µL de células eletrocompetentes foram misturadas com um volume de 0,7 a 1 µL de plasmídeo ou reação de ligação. As células foram submetidas a um campo elétrico (4KΩ, 330µF) em cubetas de eletroporação. Após o choque, as células foram ressuspensas em 1 mililitro de meio SOC e incubadas a 37°C durante 1 hora, sem agitação. Após a recuperação, as culturas foram plaqueadas em meio LA na presença de antibiótico seletivo.

#### 4.7 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEO PARA ESTIRPES DE *H. seropedicae* POR CONJUGAÇÃO

Para a transferência de plasmídeos por conjugação foi utilizada a estirpe S17.1 de *E. coli* como doadora do plasmídeo de interesse.

Estirpes selvagem ou mutantes de *H. seropedicae* e a estirpe S17.1 *E. coli*, contendo o plasmídeo a ser transferido, foram cultivadas durante a noite nos meios de cultura NFbHPN-Malato e LB, respectivamente, até obtenção de D.O.<sub>600</sub> = 1,0 (cerca de 10<sup>8</sup> bactérias). Após, foram misturados e homogeneizados em agitador “vortex” 1mL da cultura de *H. seropedicae* com 20-50µL da cultura de *E. coli* S17.1. As células foram sedimentadas por centrifugação, o sobrenadante descartado e cerca de 200µl do sobrenadante que restou no tubo foram plaqueados em meio LA/NFbHPN-Malato (1:4) em forma de gota e incubado em estufa 30°C durante 24h. Após, a biomassa celular foi coletada e diluída em 1mL de meio NFb-Malato. Para a obtenção de colônias isoladas, 1 µL da diluição foi plaqueada com 100 µL de meio NFbHPN-Malato, em placas contendo o meio NFbHPN-Malato sólido com o antibiótico seletivo, e incubadas a 30 °C por 48h.

#### 4.8 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

##### Mini Preparação de plasmídeos

A purificação de plasmídeos de *E. coli* em pequena escala foi baseada no método da lise alcalina segundo SAMBROOK *et al.*, (1989) com algumas modificações.

Três mililitros de cultura de *E. coli* DH10B contendo o plasmídeo de interesse, crescida durante a noite em meio LB adicionado de antibióticos seletivos, foram transferidos para tubos plásticos de 1,5 mL e as células foram coletadas por centrifugação (13.400 rpm, 2 minutos) e ressuspensas em 200 µL de solução GET (Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0; glucose 50 mmol/L; EDTA 10 mmol/L). Em seguida as células foram lisadas com adição de 200 µL de uma solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (m/v)). Após a lise, as proteínas, o DNA cromossômico, os restos

celulares e o SDS foram precipitados com adição de 200 µL de acetato de potássio (3 mol/L, pH 4,8). Após 5 minutos no gelo foram adicionados mais 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e as amostras foram incubadas por mais 5 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas (13.400 rpm, 5 minutos) e o sobrenadante coletado. O DNA plasmidial foi precipitado com 60% de isopropanol, lavado duas vezes com 500 µL e 1 mL de etanol 70%, seco e dissolvido em 30 µL de água ultrapura contendo 10µg/ml de RNase. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### Purificação de plasmídeos em larga escala

Quarenta mililitros de cultura de *E. coli* DH10B contendo o plasmídeo de interesse, crescida durante a noite em meio LB adicionado de antibióticos seletivos, foram transferidos para tubos de centrifuga de 50 ml. As células foram coletadas por centrifugação (8.000 rpm, 5 minutos) e ressuspensas em 5ml de solução GET (Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glucose 50 mmol/L; EDTA 10 mmol/L). As células foram lisadas com adição de 5 ml de uma solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%). Após a lise, as proteínas, o DNA cromossômico, os restos celulares e o SDS foram precipitados com adição de 5 ml de acetato de potássio (3 mol/L, pH 4,8). A mistura foi homogeneizada em agitador “vortex” e deixada no gelo por 10 minutos, em seguida, as proteínas do sobrenadante foram extraídas com adição de 2 ml de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a amostra homogeneizada novamente. As amostras foram então centrifugadas (8.000 rpm, 5 minutos) e a fase aquosa coletada. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol, lavado com 30 ml de etanol 70%, seco à vácuo e dissolvido em 250µL de água ultrapura contendo 10µg/ml de RNase. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 4.9 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO

Vários tipos de agarose são disponíveis onde os grupos hidroxí-etil são introduzidos na cadeia polissacarídica. Essa substituição leva à formação de gel em uma temperatura de aproximadamente 30°C e ao derretimento à 65°C, temperatura menor do que a necessária para desfazer a dupla fita de DNA. Para a obtenção de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão, foi utilizado o procedimento descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989) com modificações.

Após eletroforese em gel de agarose (0,7%) de baixo ponto de fusão, utilizando tampão TAE (Tris base 40 mmol/L; ácido acético 40 mmol/L; EDTA 2 mmol/L; pH 8,0), o gel foi corado com azul de metileno 0,2% sob agitação durante 30 minutos e lavado com água ultrapura até a visualização da banda esperada. Em seguida a banda de interesse foi cortada e coletada em um tubo plástico de 1,5mL. O gel foi fundido a 65°C após a adição de 1 volume de solução contendo 250 mmol/L de NaCl, 100 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mmol/L de EDTA (concentração final). Esta mistura foi aquecida novamente a 65°C para a manutenção da agarose no estado líquido, sendo então adicionado 1 volume de fenol equilibrado (pH 8,0). Esta mistura foi homogeneizada em agitador “vortex” (cinco ciclos de 15 segundos). Posteriormente a amostra foi incubada por 30 a 60 minutos em temperatura ambiente, com agitação a cada 5 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada (13.400 rpm, 5 minutos), o sobrenadante (fase aquosa) coletado e precipitado com 1 volume de isopropanol. Após a precipitação, o DNA foi sedimentado por centrifugação (13.400 rpm, 5 minutos), lavado com etanol 70%, seco e dissolvido em 10 µL de água ultrapura.

#### 4.10 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

A técnica da reação da polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) permite obter um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial, a partir de uma pequena quantidade de DNA molde. As reações de amplificação foram feitas em termociclador Mastercycler® (eppendorf) e

os sistemas de reação continham enzima *Taq* DNA polimerase 1-5 unidades por reação de 20-100µl, tampão de PCR FERMENTAS® 10 X *Taq* Buffer + KCl (100mM Tris-HCl (pH8,8); 500mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40) ou 10X *Taq* Buffer + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (750mM Tris-HCl (pH8,8); 200mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1% (v/v) Tween 20), dNTP 0,2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L e 5-10pmol de oligonucleotídeos iniciadores (AZEVEDO *et al*, 2003-adaptado). Os parâmetros de ciclos de amplificação variaram conforme os oligonucleotídeos utilizados.

#### 4.11 OBTENÇÃO DE DNA MOLDE, A PARTIR DE CULTURA, PARA REAÇÃO DE PCR

Cem microlitros de uma cultura fresca de *H. seropedicae*, crescida em meio NFbHPN-Malato, foram centrifugados (13.400 rpm, 1 minuto) e todo o sobrenadante descartado. O sedimento de células foi lavado com 500µL de água ultra pura estéril, centrifugado (13.400 rpm, 30 segundos) e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 500µL de água ultra pura estéril e fervida por cinco minutos. Após centrifugação (13.400 rpm, 5 minutos), alíquotas do sobrenadante, contendo o DNA molde, foram usadas para as reações de PCR.

#### 4.12 SUBCLONAGEM DOS PROMOTORES HrpL-DEPENDENTES.

Os plasmídeos pGEM-*Thrp*-box1, pGEM-*Thrp*-box2 e pGEM-*Thrp*-box3 foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI para a liberação dos fragmentos desejados, os quais foram analisados em gel de agarose 1%. Após esta reação de restrição, o vetor linearizado e os fragmentos liberados foram tratados com 1U de enzima SAP USB® (*shrimp alkaline phosphatase*), durante 1 hora a 37°C, para sua desfosforilação e a enzima EcoRI foi inativada a 65°C por 15 min.

Uma reação contendo o vetor pGEM®-T, os fragmentos das regiões promotoras *hrp*-box1, *hrp*-box2 e *hrp*-box3 e o vetor purificado pMP220 foram utilizados na reação de ligação como no item 4.4. A seleção de clones foi feita por antibiótico seletivo, uma vez que o vetor pMP220 confere resistência a tetraciclina. Finalmente, os clones foram confirmados por restrição e sequenciamento.

#### 4.13 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando didesoxirribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977). As amostras foram sequenciadas utilizando o sequenciador automático de DNA ABI377 (Applied Biosystem).

Este método foi utilizado para a confirmação das sequências de DNA clonadas nos vetores pTZ57R/T e subclonados nos vetores pMP220 e pPW452. Para os clones em pTZ57R/T o sequenciamento foi feito utilizando os *primers* Reverso e Universal e para os clones em pMP220 e pPW452 utilizou-se o *primer lacZrev* (5'GCAAGGCGATTAAGTTGGGT3'). Para a confirmação da direção correta de inserção, no vetor pMP220, das prováveis regiões regulatórias *hrp*-box1, *hrp*-box2 e *hrp*-box3, de *H. seropedicae* utilizaram-se os *primers* específicos chamados *hrcVinterREV* (AGGCATGATGCTACCTTAGC), *hrcCinterREV* (CAAGGGGCCACTGCGATG) e *hrpQinterREV* (GCCGTCGACAATGCGCAGT), respectivamente.

#### 4.14 CONDIÇÕES DE INDUÇÃO PARA TESTAR A ATIVIDADE DOS PROMOTORES HrpL-DEPENDENTES.

As condições de indução para testar a atividade dos promotores HrpL-dependentes foram as seguintes:

- Meio NFbHPN-Malato completo + 10% de extrato de cana-de-açúcar
- Meio NFbHPN-Malato (sem CaCl<sub>2</sub>) + 5mM de CaCl<sub>2</sub> (adicionado no momento do uso)
- Meio NFbHPN-Malato (sem CaCl<sub>2</sub>) + 10mM de CaCl<sub>2</sub> (adicionado no momento do uso)
- Meio NFbHPN-Malato + ácido salicílico 10μM.
- Meio XOM1 + xilose (0,18%)
- Meio XOM1 + glucose (0,18%)
- Meio XOM2 + xilose (1%)
- Meio XOM2 + glucose (1%)

- Meio XOM2 + arabinose (1%)
- Meio XOM2 + ramnose (1%)

*H. seropedicae* foi pré-cultivado durante a noite em meio NFbHPN-Malato. No dia seguinte 75µL de cultura foram inoculados em 3ml do meio de indução, que foi cultivado por 16h a 30°C, e com esta cultura a atividade β-galactosidase foi determinada.

*E. coli* foi pré-cultivada em meio LB. A atividade β-galactosidase foi determinada a partir de um re-inóculo de células cultivadas durante a noite em meio LB.

#### 4.14.1 Preparo de extrato de cana-de-açúcar

O extrato de cana-de-açúcar foi obtido do colmo de cana-de-açúcar moído. O extrato foi centrifugado a 2500 xg por 5 minutos, e o sobrenadante foi esterelizado em filtro (TPP 0,2µm).

#### 4.14.2 Preparo de soluções de açúcares

Foram feitas soluções de 10% de arabinose, xilose, ramnose e glucose (MERCK) em água MilliQ ultrapura, esterelizadas pelo sistema de filtração MilliPore, previamente autoclavado, utilizando membrana (0,2µm). Após o preparo, as soluções foram mantidas a 4°C.

As fontes de carbono como arabinose e ramnose foram escolhidas pois são açúcares presentes na parede celular das plantas. Xilose e glucose são fontes de carbono utilizadas nos meios de cultura indutores de genes *hrp* (KUBO *et al.*, 2002).

#### 4.14.3 Preparo de solução de ácido salicílico

Uma solução de ácido salicílico (SIGMA) na concentração 1mol/L foi feita utilizando etanol absoluto (MERCK) como solvente. A solução foi mantida a 4°C.

#### 4.15 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE $\beta$ -GALACTOSIDASE.

Este ensaio foi realizado como descrito por Miller (1972) com modificações.

Para determinar a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi feito o seguinte procedimento: alíquotas de 100  $\mu$ L das culturas (condições de cultivo item 4.14) foram coletadas e adicionadas a 900 $\mu$ L de tampão Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  60 mmol/L;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  40 mmol/L; KCl 10 mmol/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mmol/L;  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,0027%; pH 7,0). Em seguida, 25  $\mu$ L de clorofórmio foram adicionados ao sistema, o qual foi agitado em agitador “vortex” por 5 segundos e incubado a 30°C. Após 5 minutos a reação foi iniciada pela adição de 200  $\mu$ L de ONPG (*o*-nitrofenil  $\beta$ -D-galactosídeo 4 mg/mL, preparado em tampão Z). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1mol/L. A absorbância de *o*-nitrofenol foi determinada em 420 nm em leitor de microplaca (Bio Tek). A atividade específica de  $\beta$ -galactosidase foi expressa em Unidades Miller (MILLER, 1972) ou foi dada em nanomoles de ONP formado por minuto por miligrama de proteína total (nmol ONP/min/mg proteína).

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidase (MILLER, 1972)} = \frac{1000 \times (\text{D.O}_{420} - 1,75 \times \text{D.O}_{550})}{t (\text{tempo}) \times v (\text{volume}) \times \text{D.O}_{600}}$$

#### 4.16 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A verificação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de BRADFORD (1976). Alíquotas de 50  $\mu$ L de cultura de *H. seropedicae* foram transferidas para poços de microplaca de 96 poços contendo 50  $\mu$ L de NaOH 0,2mol/L. A solução foi homogeneizada suavemente e incubada por pelo menos 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, 30  $\mu$ L da mistura de lise foram transferidos para uma placa de ELISA e adicionou-se 170  $\mu$ L de reativo de Bradford (100 mg/L de Coomassie blue G-250 dissolvido em 50 mL de etanol, 100 mL/L de ácido fosfórico 85%). As reações foram homogeneizadas rapidamente e foi feita leitura da  $\text{D.O}_{595}$  em leitor de microplaca (Bio Tek). A curva padrão foi obtida utilizando BSA em concentrações de 1  $\mu$ g até 10  $\mu$ g.



#### 4.17 ENSAIO DE ADESÃO E COLONIZAÇÃO

Ensaio de adesão e colonização foram feitos segundo MONTEIRO e colaboradores (2008). As estirpes testadas foram *H. seropedicae* SmR1 selvagem e mutantes MK1 e RAMHN1.

##### 4.17.1 Germinação e inoculação

Sementes de milho SHS 3031 (*Zea mays*) foram esterilizadas e plantadas em blocos estéreis contendo tiras de papel filtro (9 X 2 cm) embebidas com 3 mililitros de *Plant-Medium* (EGENER *et al.*, 1999) (0,2g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1g/L NaCl; 0,026g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,00164g/L Fe-EDTA; 1,5g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5g/L Malato; 0,001g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,001175g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,0014g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,00004 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,00012g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Os blocos foram envolvidos com papel plástico estéril e deixados em sala de incubação a 25°C com um fotoperíodo de 12 horas sob iluminação de intensidade 1250 lux com lâmpadas brancas fluorescentes. As sementes de arroz BRS FORMOSO (*Oryza sativa*), descascadas e esterilizadas, foram germinadas em placas de petri contendo meio sólido ágar-água, durante três dias em sala de incubação a 25°C, sem iluminação.

Tanto as plântulas de milho como as de arroz foram inoculadas através da incubação, durante 15 minutos, com  $10^5$  células das estirpes a serem testadas, a partir de uma cultura fresca diluída em meio NFbHPN-Malato. Após a inoculação, algumas plântulas foram utilizadas para o ensaio de adesão e outras utilizadas para o ensaio de colonização. As plântulas de milho a serem utilizadas no ensaio de colonização foram recolocadas nos blocos estéreis contendo tiras de papel filtro. As plântulas de arroz, a serem utilizadas no ensaio de colonização, foram replantadas, após a inoculação, em tubos de vidro contendo meio *plant-medium* semi-sólido (ágar 0,175%).

#### 4.17.2 Contagem de bactérias

Para o ensaio de adesão as plântulas inoculadas foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9%. A raiz principal de cada plântula foi cortada, colocada em tubo de 1,5 ml e pesada. Em seguida adicionou-se 1 ml de solução salina de NaCl 0,9%. Para que houvesse a liberação das células aderidas à raiz, o tubo foi agitado por 40 segundos em agitador “vortex”. Para contagem de unidades formadoras de colônias, diluições seriadas foram feitas e plaqueadas em meio NFbHPN-Malato, as placas foram deixadas por aproximadamente 24h em estufa a 30°C. Para o ensaio de colonização as plântulas foram esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito 1% por 2 minutos, etanol 70% por 2 minutos e lavadas quatro vezes com água destilada estéril. Em seguida, a raiz principal foi pesada e triturada em 1 mL de solução salina de NaCl 0,9%. Igualmente ao ensaio de adesão diluições seriadas foram feitas e plaqueadas em meio NFbHPN-Malato e as placas foram deixadas por aproximadamente 24h em estufa a 30°C.

#### 4.18 ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES

As sementes de milho (*Zea mays*) SHS 3031 (Santa Helena) foram esterilizadas superficialmente pelos seguintes tratamentos sucessivos:

1. Solução hipoclorito de sódio 1% + 0,4% Tween 20 por 20 minutos
2. Solução etanol 70% por 5 minutos
3. Lavagem com água destilada estéril (quatro repetições)

As sementes de arroz (*Oryza sativa*) BRS FORMOSO (EMBRAPA) foram descascadas e esterilizadas superficialemente pelos seguintes tratamentos sucessivos:

1. Solução hipoclorito de sódio 1% + 0,4% Tween por 3 minutos
2. Solução etanol 70% por 3 minutos
3. Lavagem com água destilada estéril (quatro repetições)

#### 4.19 CONDIÇÕES DE PLANTIO E CULTIVOS DE PLANTAS DE TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)

##### 4.19.1 Preparo do substrato para germinação

A mistura para o preparo do substrato foi composta por substrato orgânico (Plantmax) + vermiculita (não lavado) na proporção 1:1 e 1 g de fertilizante NPK 10.10.10 por litro de substrato. O preparo foi feito em uma bandeja grande, para possibilitar a homogeneização dos ingredientes (Manual do modelo vegetal Micro-Tom – adaptado – comunicação pessoal - Dr. Lázaro E. P. Peres - ESALQ).

##### 4.19.2 Semeadura

O substrato foi distribuído em uma bandeja de 30 cm de diâmetro e regado com água. Cerca de 30 sementes (não esterilizadas) foram distribuídas regularmente e enterradas cerca de 5mm. A bandeja foi mantida úmida, mas não encharcada, até ocorrer a germinação (a falta de aeração e excesso de sais nos vasos encharcados impede a germinação) em uma sala de incubação a 25 °C utilizando um fotoperíodo de 12 horas sob iluminação de intensidade 1250 lux com lâmpadas brancas fluorescentes (Manual do modelo vegetal Micro-Tom – adaptado – comunicação pessoal - Dr. Lázaro E. P. Peres - ESALQ).

##### 4.19.3 Transplântio

Após a germinação, plântulas individuais foram transferidas para vasos do tipo Magenta<sup>®</sup> contendo vermiculita (Figura 7). O transplântio foi feito após 21 dias de semeadura com plântulas contendo pelo menos um par de folhas bem desenvolvidas e o segundo já formado, além das folhas cotiledonares. As plântulas foram retiradas com o máximo possível de substrato aderido às raízes e colocadas nos vasos. A irrigação foi feita colocando-se um vaso do tipo Magenta<sup>®</sup> contendo água estéril e um pedaço de algodão conectando as duas metades do vaso onde foi feito o transplante, permitindo assim a obtenção de água pela planta (Manual do

modelo vegetal Micro-Tom – adaptado – comunicação pessoal - Dr. Lázaro E. P. Peres - ESALQ).



**FIGURA 7: Vaso utilizado para transplântio de plântulas de tomate Micro-Tom.**

Vaso do tipo Magenta® contendo na parte inferior água estéril e um pedaço de algodão e na parte superior vermiculita e a planta.

#### 4.19.4 Adubação

A adubação foi feita na hora do transplântio e na floração, com adubo NPK (1g por litro de substrato) sobre o substrato vermiculita (Manual do modelo vegetal Micro-Tom – adaptado – comunicação pessoal - Dr. Lázaro E. P. Peres - ESALQ).

#### 4.20 INFILTRAÇÃO DE FOLHAS DE TOMATEIRO MICRO-TOM

As culturas de *H. seropedicae* a serem infiltradas foram crescidas até atingir  $D.O_{600} = 1,0$  ( $10^8$  células). Em seguida, 1,5 ml de cultura foram transferidos para tubos estéreis e centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm. Após, as células foram ressuspensas em 1,5 ml de sulfato de magnésio 10 mmol/L.

Essa suspensão de células foi infiltrada (100-200 $\mu$ L), na superfície abaxial de folhas saudáveis de tomate MT, com o auxílio de uma seringa estéril sem agulha.

#### 4.21 OBTENÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE MK1 DE *H. seropedicae*

A estirpe mutante MK1 obtida por Marco A. S. Kadowaki (comunicação pessoal) foi gerada pela inserção de um plasmídeo contendo um cassete de resistência ao antibiótico canamicina e a porção interna do gene *hrpL* no gene *hrpL*, do genoma de *H. seropedicae*, através de recombinação homóloga. Para isso, *primers* internos ao gene *hrpL* foram sintetizados e o fragmento interno deste gene foi amplificado e clonado no vetor pCR2.1-TOPO Km<sup>R</sup> (Invitrogen). Este plasmídeo foi inserido no genoma da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* por recombinação com o gene *hrpL* da bactéria. Dessa forma obtiveram-se células onde o gene *hrpL* estava interrompido pelo vetor pCR2.1 e estas células foram selecionadas pela resistência ao antibiótico canamicina. O processo descrito está esquematizado na figura 8.

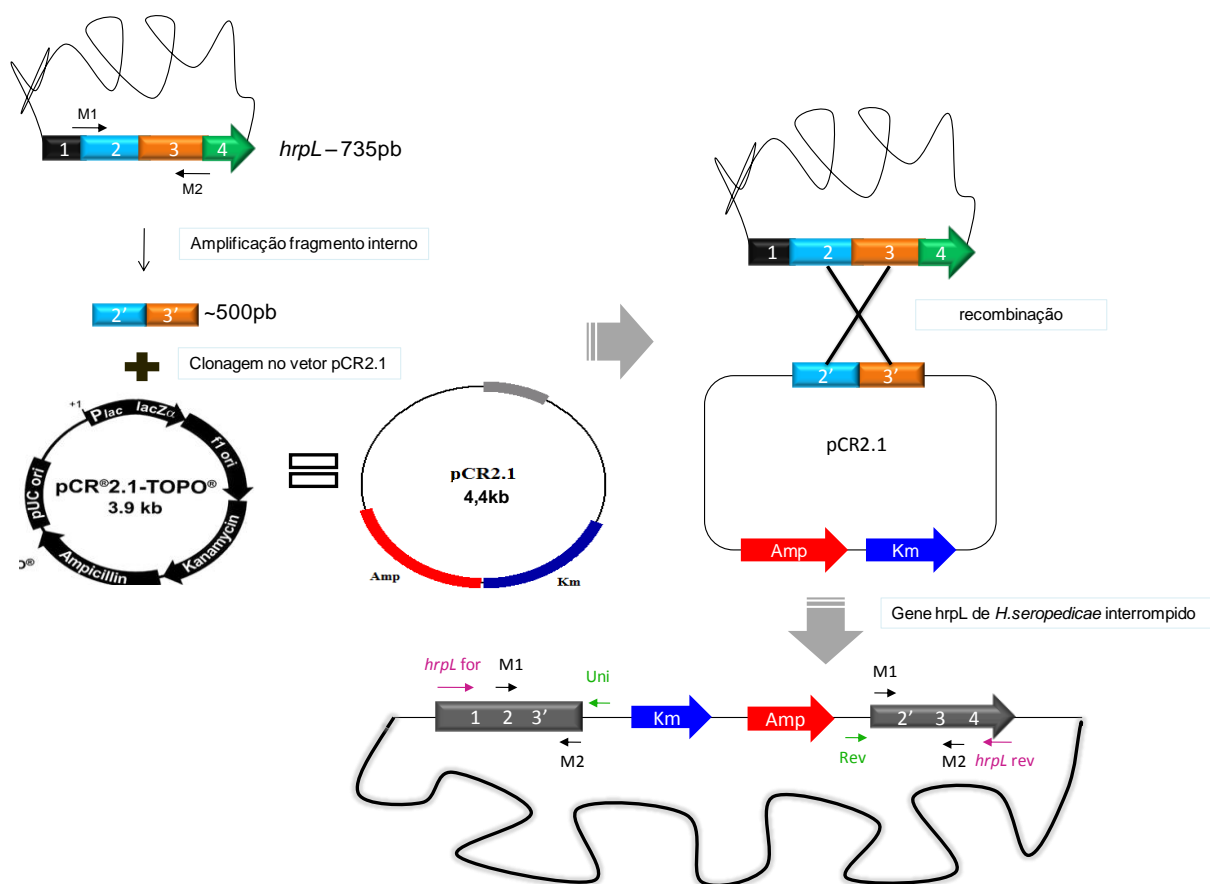


FIGURA 8: Esquema de obtenção do mutante MK1 de *H. seropedicae* por Marco Antônio S. Kadowaki (comunicação pessoal).

Para a confirmação da interrupção do gene *hrpL* da estirpe MK1 *primers* específicos foram utilizados para amplificar fragmentos do gene *hrpL*. O DNA molde para a reação de PCR foram culturas de *H. seropedicae* SmR1 e MK1 diluídas na proporção 1:10. As concentrações dos reagentes da reação são as descritas no item 4.10 e os parâmetros do termociclador para amplificação da região de interesse foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C para a abertura inicial da dupla fita de DNA; 32 ciclos de 15 segundos a 95°C para a abertura das fitas, 30 segundos a 55°C para o anelamento dos oligonucleotídeos com a fita de DNA, e 30 segundos a 72°C para a extensão da fita nascente. O produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 4.22 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS- PAGE)

As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por LAEMMLI (1970) e estão resumidas nas tabelas 4, 5 e 6. A concentração do gel de corrida foi de 12,5% para as análises da proteína HrpL

TABELA 4: SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE DESNATURANTE DE PROTEÍNA

Acrilamida	40% Acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1)	Armazenada a 4 °C
Solução 2	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	Armazenada a 4 °C
Solução 3	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	Armazenada a 4 °C
10% PA	Persulfato de amônio 10% v/v em água	Armazenada a 4 °C
Tampão de amostra	2% SDS, 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol (adicionado no momento do uso)	Armazenada a 4 °C
Tampão de corrida 10X concentrado	30 g Tris-base; 140 g glicina; 10g SDS por litro	Armazenado a temperatura ambiente

TABELA 5: GEL DE EMPILHAMENTO

<b>Componente</b>	<b>Volume para 2 géis</b>
Solução acrilamida	487,5 µL
Solução 3	1,3 mL
H <sub>2</sub> O	3,162 mL
10% PA	25 µL
TEMED	10 µL
SDS 10%	50 µL
<b>Vol. final</b>	<b>5,034 ml</b>

TABELA 6: GEL SEPARADOR

<b>Componente</b>	<b>Volume para 2 géis 12,5%</b>
Solução acrilamida	3 mL
Solução 2	2,5 mL
H <sub>2</sub> O	4,35 mL
10% PA	50 µL
TEMED	5 µL
SDS 10%	100 µL
<b>Vol. final</b>	<b>10 ml</b>

As eletroforeses foram realizadas utilizando o sistema vertical (HOEFER). As corridas foram realizadas a 100-200V em tampão de corrida (tris base 25mmol/L; glicina 0,25mmol/L; SDS 0,1%; pH 8,0) por 1 a 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant R250 0,1% em 10% de ácido acético e 40% de etanol e descorados em solução contendo 10% de ácido acético e 40% de metanol.

#### 4.23 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HrpL DE *H. seropedicae* EM *E. coli* DH10B

A expressão da proteína HrpL de *H. seropedicae* foi realizada em células de *E. coli* DH10B, contendo o plasmídeo pDK7HrpL, o qual foi construído a partir do plasmídeo pET29aHrpL (SOUZA, não publicado). O plasmídeo pET29aHrpL foi digerido com as enzimas de restrição HindIII/XbaI, liberando o fragmento contendo o gene *hrpL* que foi subclonado no vetor pDK7 digerido com as enzimas HindIII/XbaI. O plasmídeo pDK7HrpL e o vetor pDK7 foram transformados em *E. coli* estirpe DH10B. Para a expressão de HrpL em pequena escala três mililitros de meio LB foram inoculados com 30µL de uma cultura de *E. coli*, contendo o plasmídeo pDK7HrpL ou vetor pDK7, incubada durante a noite. As células foram cultivadas a 37°C sob agitação por três horas até atingir uma DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,5. Neste momento foi adicionado IPTG 1 mmol/L e a cultura foi incubada a 20°C sob agitação (120 rpm), durante a noite. Paralelamente, uma cultura foi feita da mesma forma, mas sem adição do indutor IPTG. Para o preparo das amostras um mililitro da cultura foi centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. As células foram ressuspensas em aproximadamente 100µL de tampão de amostra (2% SDS; 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625M Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol) e aquecidas por 5 minutos a 90°C para desnaturação das proteínas. Estas amostras foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS–PAGE) como descrito por LAEMMLI (1970) (item 4.22). O controle negativo foi *E. coli* DH10B contendo o vetor pDK7.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONFIRMAÇÃO DO MUTANTE MK1 (SmR1 *hrpL*<sup>-</sup>)

O mutante MK1, contendo o gene *hrpL* interrompido, foi obtido como descrito no item 4.21 de materiais e métodos. A ocorrência de simples recombinação entre o gene *hrpL* do genoma de *H. seropedicae* e a porção interna deste gene clonada no vetor pCR2.1 permitiu a inserção do plasmídeo inteiro no genoma, ocasionando a interrupção do gene *hrpL*. O fato do fragmento clonado no plasmídeo não possuir o início nem o fim do gene impediu a reconstituição do gene *hrpL*.

Neste trabalho a mutação no gene *hrpL* foi confirmada através de reações de PCR utilizando diversas combinações de *primers*. Os pares de *primers* utilizados foram: (i) UNIVERSAL e REVERSO que são complementares ao vetor pCR2.1, usado para obter o mutante, (ii) o par *hrpL*FOR e *hrpL*REV, que são complementares às extremidades do gene *hrpL*, e (iii) o par *hrpLM*1 e *hrpLM*2, que amplificam a região interna do gene *hrpL* (Tabela 7). O esquema mostrando o local de anelamento destes *primers* no genoma das estirpes SmR1 (selvagem) e MK1 (mutante) está na figura 9. Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em géis de agarose 1%, em tampão TBE 1X.

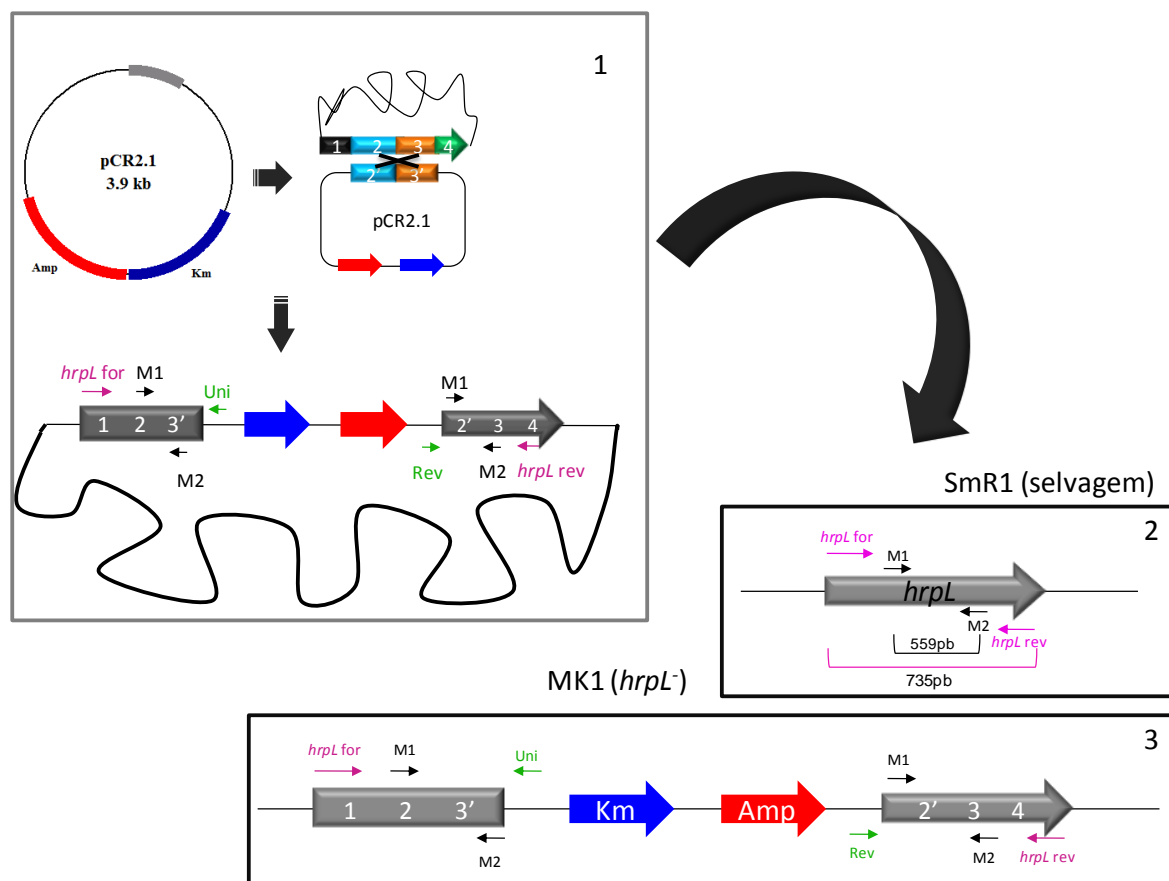


FIGURA 9: Esquema representativo de obtenção do mutante *H. seropedicae* MK1 com as regiões de anelamento dos *primers* utilizados para confirmação da mutação.

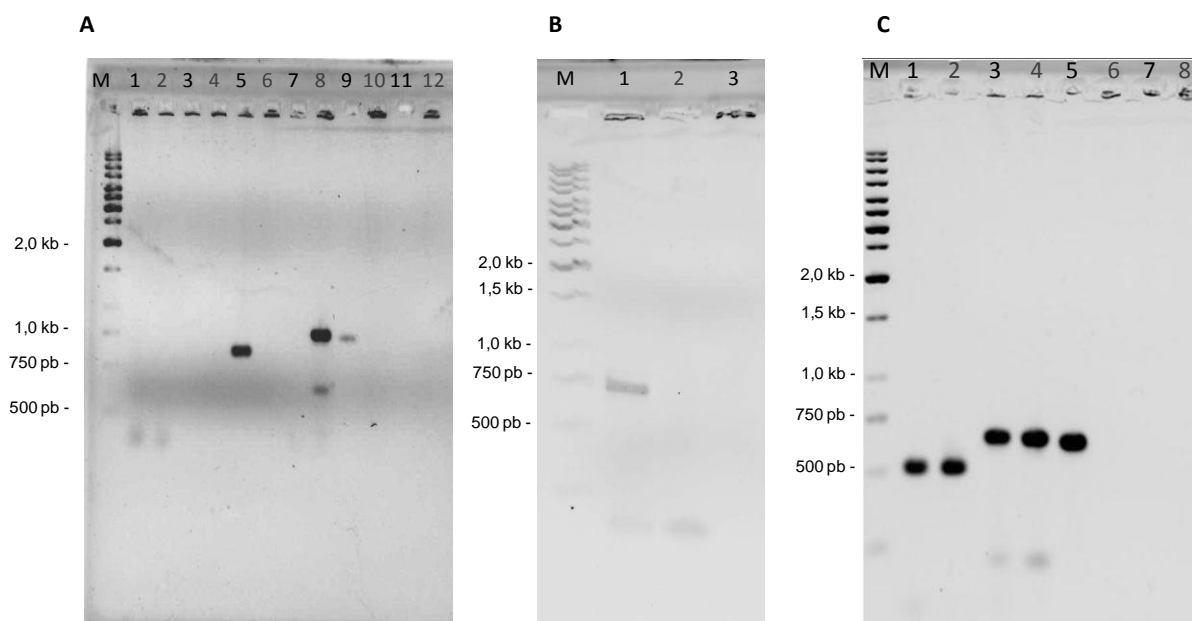
Painel 1: Esquema de obtenção do mutante MK1 contendo o gene *hrpL* interrompido. Painel 2 e 3: Região de anelamento dos *primers* *hrpL*FOR, *hrpL*REV, *hrpL*M1, *hrpL*M2, UNIVERSAL e REVERSO utilizados para as reações de PCR de confirmação do mutante MK1 e do controle SmR1 (selvagem). 1 representa a porção inicial do gene *hrpL*, 2 e 3 representam a parte interna deste gene e 4 representa o fim do gene *hrpL*. 2' e 3' representam a região interna do gene *hrpL* amplificada com os *primers* *hrpL*M1 e *hrpL*M2.

TABELA 7: NOME E SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* ESPECÍFICOS UTILIZADOS PARA CONFIRMAR O MUTANTE MK1.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'→3')
<i>hrpL</i> FOR	ATCTGCCAAGGACCATAT
<i>hrpL</i> REV	GCCTTCGAACCTGCTCCCTCA
<i>hrpL</i> M1	CCCTCACCATCGCCAACCC
<i>hrpL</i> M2	TTGCGCTTCTTCATAGG

A utilização de diversas combinações de *primers* permitiu a confirmação da mutação na estirpe MK1 de *H. seropedicae*. A reação de amplificação utilizando a combinação dos *primers* *hrpLM2* e REVERSO resultou em um produto de 559pb, o tamanho esperado para a região interna do gene *hrpL*, enquanto quando o DNA da estirpe selvagem foi utilizado como molde, não houve amplificação, já que os *primers* REVERSO e UNIVERSAL não anelam no DNA desta estirpe (Figura 10A). Além disso, a amplificação utilizando a combinação *hrpLFOR* e UNIVERSAL resultou em um produto de aproximadamente 750pb que correspondente ao tamanho do gene *hrpL* (735pb) (Figura 10A). Quando os *primers* *hrpLFOR* e *hrpLREV* foram utilizados foi obtido um amplificado de 735pb a partir do DNA da estirpe selvagem, mas quando o DNA genômico da estirpe mutante foi utilizado não ocorreu amplificação (Figura 10A). Este resultado sugere que o vetor pCR2.1 foi inserido nesta região do gene *hrpL*, pois devido ao seu tamanho de 4,65kb (3,9kb (pCR2.1) + 735pb (*hrpL*)) a amplificação é ineficiente nas condições utilizadas. A amplificação utilizando os *primers* *hrpLREV* e REVERSO (Figura 10B), bem como *hrpLM1* e UNIVERSAL (Figura 10C), só gerou fragmentos quando foi utilizado o DNA da estirpe mutante como molde, confirmando a mutação no gene *hrpL*.

Como esperado a utilização dos *primers* *hrpLM1* + REVERSO (Figura 10C), *hrpLM2* + *hrpLREV*, *hrpLM2* + UNIVERSAL, *hrpLFOR* + REVERSO (Figura 10A) e *hrpLREV* e UNIVERSAL (Figura 10B) e DNA molde das estirpes selvagem e mutante em reações de PCR não resultaram em produtos, já que estes pares de *primers* estão orientados para a mesma direção. Também como o esperado a reação de amplificação da região interna do gene *hrpL* a partir do DNA de ambas as estirpes utilizando os *primers* *hrpLM1* + *hrpLM2* (Figura 10C) resultou em um produto de 559pb. A amplificação com os *primers* *hrpLM1* + *hrpLREV* (Figura 10C) a partir do DNA da estirpe selvagem e mutante resultou em um produto de 685pb, como esperado.



**FIGURA 10:** Perfil eletroforético dos produtos das reações de PCR para confirmação da mutação do gene *hrpL* na estirpe MK1 de *H. seropedicae*.

Gel de agarose 1% em tampão TBE 1X. M = marcador de peso molecular. Nas linhas de números ímpares foram utilizados DNA da estirpe mutante MK1 como molde, e nas linhas de números pares da estirpe selvagem SmR1.

Painel A: Na linha 1 e 2 foram utilizados os *primers* *hrpLM2*+*hrpLREV*, nas linhas 3 e 4 os *primers* *hrpLM2* + UNIVERSAL, nas linhas 5 e 6 a combinação utilizada foi *hrpLM2* + REVERSO, nas linhas 7 e 8 foram os *primers* *hrpLFOR* + *hrpLREV*, nas linhas 9 e 10 utilizou-se os *primers* *hrpLFOR* + UNIVERSAL e nas linhas 11 e 12 foram os *primers* *hrpLFOR* + REVERSO.

Painel B: Na linha 1 e 2 utilizou-se a combinação de *primers* *hrpLREV* + REVERSO e na linha 3 foram os *primers* *hrpLREV* + UNIVERSAL.

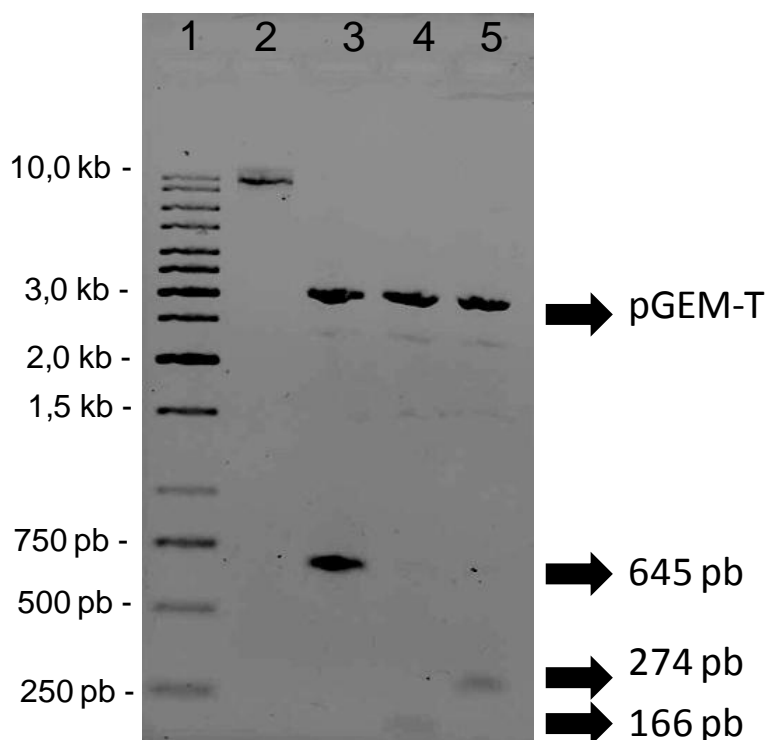
Painel C: Nas linhas 1 e 2 utilizou-se os *primers* *hrpLM1* + *hrpLM2*, nas linhas 3 e 4 foi utilizada a combinação dos *primers* *hrpLM1* + *hrpLREV*, nas linhas 5 e 6 foram os *primers* *hrpLM1* + UNIVERSAL e nas linhas 7 e 8 utilizou-se a combinação de *primers* *hrpLM1* + REVERSO.

## 5.2 SUBCLONAGEM DAS REGIÕES PROMOTORAS *hrp-box*.

A identificação de promotores e genes de patogenicidade e resposta hipersensitiva (*hrp*) expressos de maneira dependente de HrpL é importante por duas razões. Primeiro, genes que codificam proteínas efetoras secretadas pelo SST3 são expressos a partir de promotores *hrp*-dependentes; identificar estes promotores é o primeiro passo para encontrar candidatos a genes efetores.



No presente trabalho, as regiões promotoras HrpL-dependentes foram subclonadas no vetor de fusão pMP220. Para isso, os promotores *hrp*-box1, *hrp*-box2 e *hrp*-box3 foram retirados do vetor pGEM-T *easy* pela digestão com a enzima de restrição EcoRI e em seguida foram subclonados nos sítios da mesma enzima no vetor pMP220 (Figura 12) (item 4.12 de material e métodos).

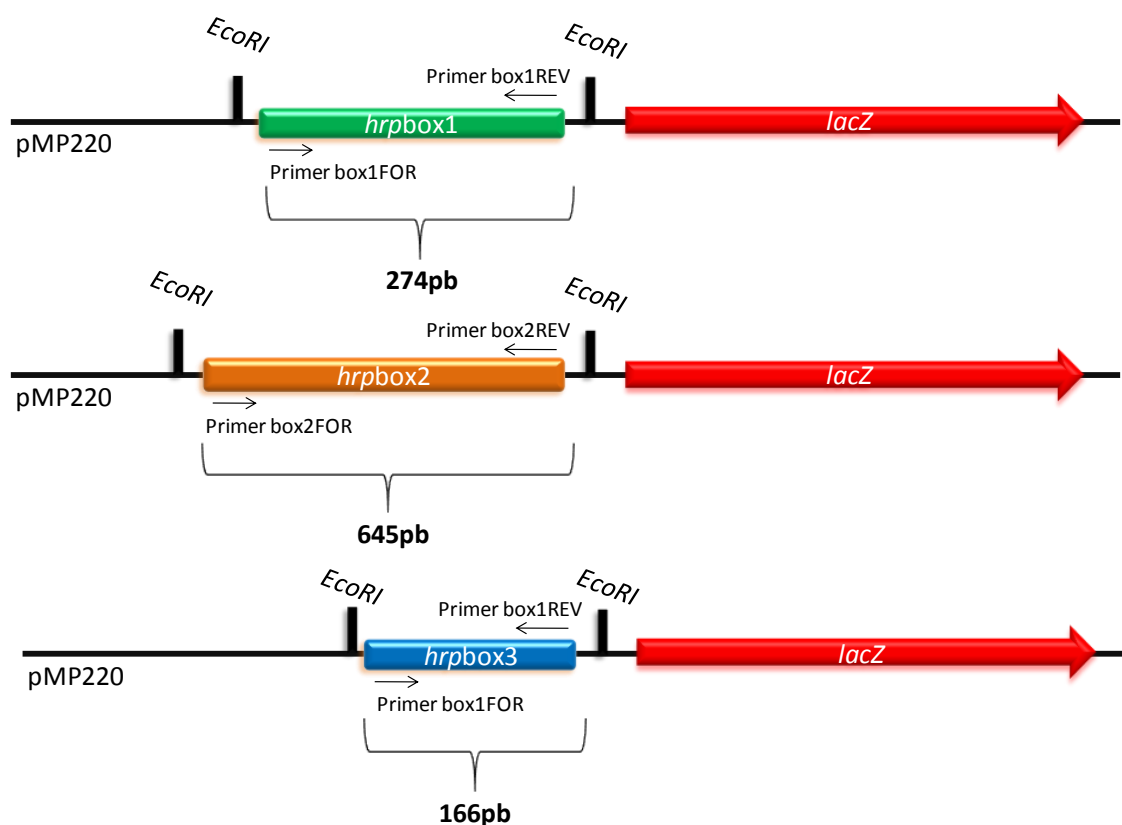


**FIGURA 12:** Perfil eletroforético de clones contendo as regiões promotoras *hrp*-box.

Na linha 1 encontra-se o marcador de peso molecular. Na linha 2 está mostrado o perfil eletroforético do vetor de clonagem pMP220 (10kb) após purificação em gel de agarose de baixo ponto de fusão (item 4.9). Na linha 3: pGEM-T*hrp*-box2, linha 4: pGEM-T*hrp*-box3 e linha 5: pGEM-T*hrp*-box1 após digestão com a enzima EcoRI sendo que o vetor foi o plasmídeo pGEMT *easy* (PROMEGA®) (~3kb). Gel de agarose 1% em tampão TBE 1X.

Foram obtidas fusões com os insertos clonados nas direções diretas (Figura 13), ou seja, na mesma direção do gene *lacZ*, e na direção inversa. Todas estas construções foram denominadas pMP*hrp*-box1 e pMP*hrp*-box1 invertido, pMP*hrp*-box2 e pMP*hrp*-box2 invertido e pMP*hrp*-box3 e pMP*hrp*-box3 invertido. Os insertos destes plasmídeos foram sequenciados para confirmar sua identidade. O sequenciamento foi feito como descrito no item 4.13 de materiais e métodos, o DNA empregado na amplificação do inserto foi obtido a partir do produto amplificado dos

plasmídeos pMP*hrp*-box1 e pMP*hrp*-box1 invertido, pMP*hrp*-box2 e pMP*hrp*-box2 invertido e pMP*hrp*-box3 e pMP*hrp*-box3 invertido utilizando *primers* específicos de cada promotor e do vetor pMP220 (*lacZ*rev). Com estas construções foram feitos os ensaios de atividade  $\beta$ -galactosidase cujos resultados serão demonstrados nos próximos itens.



**FIGURA 13:** Representação esquemática das regiões promotoras HrpL-dependentes subclonadas no vetor de fusão pMP220.

Estão mostradas as construções na ordem direta: pMP*hrp*-box1 (verde), pMP*hrp*-box2 (laranja) e pMP*hrp*-box3 (azul).

### 5.3 EXPRESSÃO DOS PROMOTORES *hrp*-box1, *hrp*-box2 e *hrp*-box3 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE INDUÇÃO EM *Herbaspirillum seropedicae*.

A regulação da expressão dos genes *hrp* é bem descrita para alguns microrganismos. Estes genes são expressos somente em plantas, ou seja, quando os microrganismos se encontram no interior do hospedeiro, ou em meios de cultura sintéticos pobres em nutrientes, e não são expressos em meio ricos em nutrientes (YANG *et al.*, 2008).

Na tentativa de encontrar uma condição de indução dos gene *hrp/hrc* de *H. seropedicae*, algumas condições de indução utilizando diferentes meios foram testadas (item 4.14). Para isso, foram empregados os meios mínimos, indutores de genes *hrp*, descritos para *X. oryzae* pv. *oryzae* (XOM1 e XOM2) usando diferentes açúcares como fonte de carbono e o meio NFbHPN-Malato, descrito para *H. seropedicae*, contendo extrato de cana-de-açúcar, ácido salicílico ou cloreto de cálcio.

Culturas de *H. seropedicae* estirpes selvagem e mutante MK1 transformadas com as construções dos promotores HrpL-dependentes, pMP*hrp*-box1 e pMP*hrp*-box1 invertido, pMP*hrp*-box2 e pMP*hrp*-box2 invertido e pMP*hrp*-box3 e pMP*hrp*-box3 invertido, foram cultivadas por 16h em meio para *H. seropedicae* (NFbHPN-Malato) e então re-inoculadas nas condições de indução descritas no item 4.14, e incubadas a 30 °C durante 16h. Alíquotas destas culturas foram utilizadas para determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase a fim de analisar a ativação transcricional dos promotores HrpL-dependentes.

Nas tabelas 8 e 9 estão mostradas as atividades de  $\beta$ -galactosidase em unidades Miller das estirpes selvagem e mutante, contendo os plasmídeos pMP*hrp*-box2, pMP*hrp*-box2 invertido e pMP*hrp*-box3, crescidas nos meios XOM1 e XOM2 adicionado de diferentes fontes de carbono. Como controle negativo foi utilizada a cultura das estirpes selvagem e mutante contendo o vetor pMP220 ou as fusões HrpL-depedentes em meio NFbHPN-Malato. A atividade de  $\beta$ -galactosidase na estirpe selvagem SmR1 contendo ou não o vetor pMP220 e no mutante MK1 de *H. seropedicae* foi baixa, não ultrapassando o valor de 5 unidades Miller. Nas estirpes contendo as fusões *hrp*-box os valores de atividade ainda foram baixos, assim



conclui-se que os meios indutores de genes *hrp* XOM1 e XOM2 não são adequados para indução da atividade de  $\beta$ -galactosidase em *H. seropedicae*.

TABELA 8: VALORES DAS ATIVIDADES  $\beta$ -GALACTOSIDASE DOS ENSAIOS EM MEIO INDUTOR XOM2 CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Estirpes de <i>H. seropedicae</i> e plasmídeos.	Atividade de $\beta$ -galactosidase (unidades Miller)			
	XOM2 +glucose 1%	XOM2 + xilose 1%	XOM2 + arabinose 1%	XOM2 + ramnose 1%
SmR1 WT	0,0	0,4	0,3	0,3
SmR1 WT pMP220	0,6	0,3	3,2	1,1
SmR1 WT + pMP <i>hrp</i> -box2	20,1	13,0	21,5	25,6
SmR1 WT + pMP <i>hrp</i> -box2invertido	13,7	8,6	37,4	13,8
SmR1 WT + pMP <i>hrp</i> -box3	12,6	4,5	9,7	12,4
MK1	0,00	0,2	1,4	1,2
MK1 + pMP <i>hrp</i> -box2	10,4	11,3	18,3	16,0
MK1 + pMP <i>hrp</i> -box2invertido	5,9	7,3	8,6	7,9
MK1 + pMP <i>hrp</i> -box3	5,5	3,5	6,8	8,9

Os valores são a média da atividade de  $\beta$ -galactosidase de cada estirpe testada em duplicata e expressa em unidades Miller (Miller, 1972).

TABELA 9: VALORES DAS ATIVIDADES  $\beta$ -GALACTOSIDASE DOS ENSAIOS EM MEIO INDUTOR XOM1 CONTENDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Estirpes de <i>H. seropedicae</i> e plasmídeos.	Atividade de $\beta$ -Galactosidase (Miller,1972)	
	XOM1 +glucose 0,18%	XOM1 +xilose 0,18%
SmR1 WT	0,0	2,8
SmR1 WT pMP220	3,5	0,0
SmR1 WT + pMP <i>hrp</i> -box2	22,7	22,5
SmR1 WT + pMP <i>hrp</i> -box2invertido	15,5	14,9
SmR1 WT + pMP <i>hrp</i> -box3	6,7	9,8
MK1	1,4	4,4
MK1 + pMP <i>hrp</i> -box2	19,8	19,4
MK1 + pMP <i>hrp</i> -box2invertido	12,4	12,7
MK1 + pMP <i>hrp</i> -box3	11,7	11,2

Os valores são a média da atividade de  $\beta$ -galactosidase de cada estirpe testada em duplicata e expressa em unidades Miller (Miller, 1972).

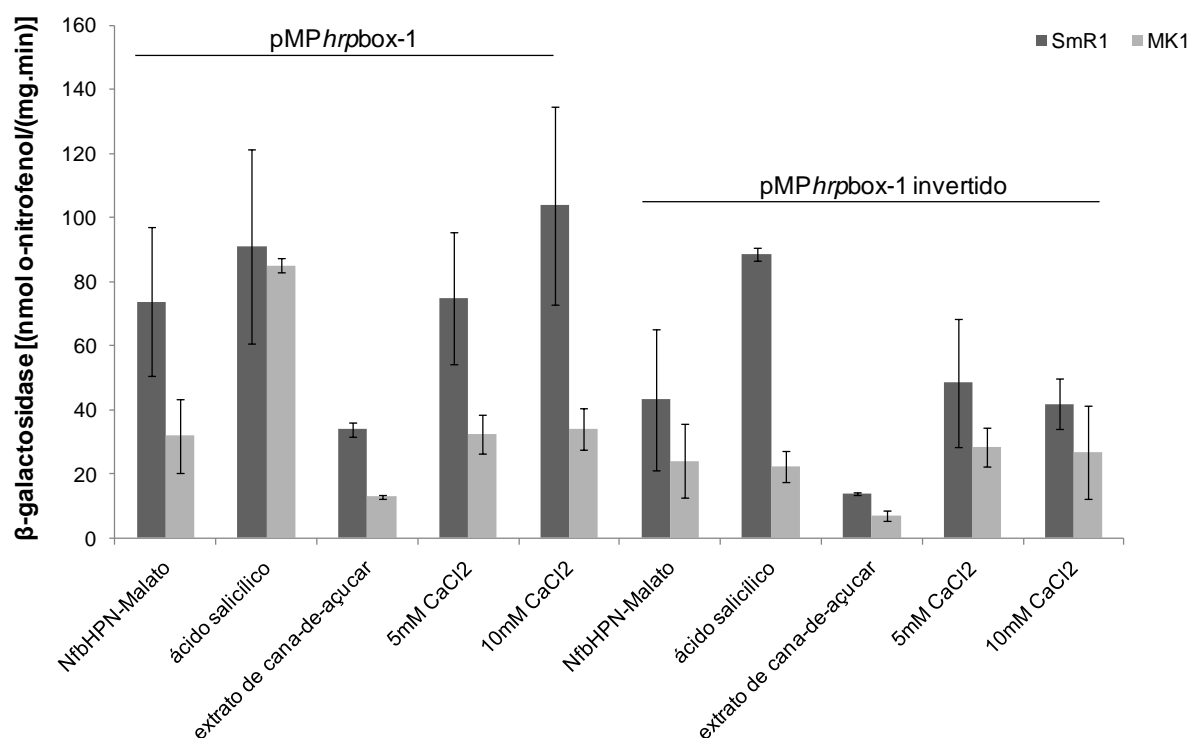
Em geral a expressão dos genes *hrp* é reprimida em meios de cultivo ricos em nutrientes e induzida em meio mínimo em microrganismos dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Ralstonia*, e *Xanthomonas* (BRENCIC, 2005). Nos meios mínimos a expressão pode ser afetada pela fonte de nitrogênio, diferentes valores de pH, condições osmóticas e fontes de carbono entre as quais manitol, frutose, sacarose e piruvato parecem ter um efeito positivo na expressão de genes *hrp*, enquanto que succinato, citrato e glutamato parecem ser inibitórios (MURPHY *et al.*, 1995). Em geral, considera-se que substratos derivados de plantas são mais eficazes na indução dos genes *hrp*. A co-cultura de *R. solanacearum* com a suspensão de células da planta hospedeira *Arabidopsis* e de tomate mostrou que a expressão do gene *hrpG*, que regula os demais genes *hrp* nesta bactéria, é aumentada quando a bactéria está em contato direto com as células da planta (ALDON *et al.*, 2000).

XIAO e colaboradores (1994) demonstraram que o promotor do gene *hrpZ*, contendo somente a sequência motivo conservada *hrp*, é ativo. O gene *hrpZ*, codifica uma proteína tipo *hairpin* (proteína produzida pela bactéria *Erwinia amylovora* e que está envolvida com a patogenicidade em macieiras), que parece ser diretamente responsável pelo fenótipo Hrp<sup>+</sup>. No entanto, a sequência dos elementos promotores é somente um dos fatores que determinam a eficiência de um promotor. A ligação da holoenzima RNA polimerase ao promotor e a transição de complexo fechado para aberto é afetada pela conformação do DNA, na região do promotor, e por proteínas acessórias (WOËSTEN, 1998).

Neste trabalho o ensaio de ativação transcricional dos prováveis promotores HrpL-dependentes foi realizado em diferentes condições de indução, utilizando o meio mínimo NFbHPN-Malato adicionado das seguintes fontes indutoras derivadas da plantas: (i) extrato de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), utilizado por se tratar de uma planta da ordem Poales (Gramineae) colonizada por *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986); (ii) ácido salicílico, escolhido porque compostos fenólicos têm um papel importante na sinalização de resposta de defesa das plantas; (iii) cloreto de cálcio, pois íons cálcio tem um importante papel como fatores de reconhecimento do hospedeiro por muitas bactérias (DEAKIN & BROUGHTON, 2009). Além disso, Ca<sup>2+</sup> está envolvido em uma variedade de processos celulares

bacterianos, incluindo ciclo e divisão celular, motilidade, patogênese e quimiotaxia (MICHIELS *et al.*, 2002).

Para determinar o papel de HrpL na ativação dos promotores *hrp* utilizou-se as estirpes selvagem e mutante *hrpL*<sup>-</sup> de *H. seropedicae*. Os plasmídeos contendo os prováveis promotores HrpL-dependentes foram transferidos para as estirpes selvagem e mutante por conjugação e as culturas de bactérias foram crescidas para o ensaio de atividade  $\beta$ -galactosidase como descrito no item 4.14. O controle negativo deste experimento foi a estirpe selvagem SmR1 contendo ou não o vetor pMP220 e o mutante MK1 de *H. seropedicae* e a atividade de  $\beta$ -galactosidase nestas estirpes foi inferior a 4 nmol de o-nitrofenol/(min.mg proteína). Nos gráficos a seguir serão apresentados os valores das atividades de  $\beta$ -galactosidase referente a ativação dos promotores *hrpbox* nas condições de cultivo contendo indutores.



**FIGURA 14:** Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a expressão dos promotores HrpL-dependentes das fusões pMP*hrp*-box1, pMP*hrp*-box1 invertido inseridas nas estirpes selvagem (SMR1) e mutante *hrpL*<sup>-</sup> (MK1) de *H. seropedicae*.

Os meios de cultivo utilizados foram: NFbHPN-Malato, NFbHPN-Malato + 10μM de ácido salicílico, NFbHPN-Malato + 10% de extrato de cana-de-açúcar e NFbHPN-Malato contendo 5 ou 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. A atividade de β-galactosidase na estirpe selvagem SmR1 contendo ou não o vetor pMP220 e no mutante MK1 de *H. seropedicae* foi inferior a 4 nmol de o-nitrofenol/(min.mg proteína). Cada experimento foi feito uma vez em duplicata.

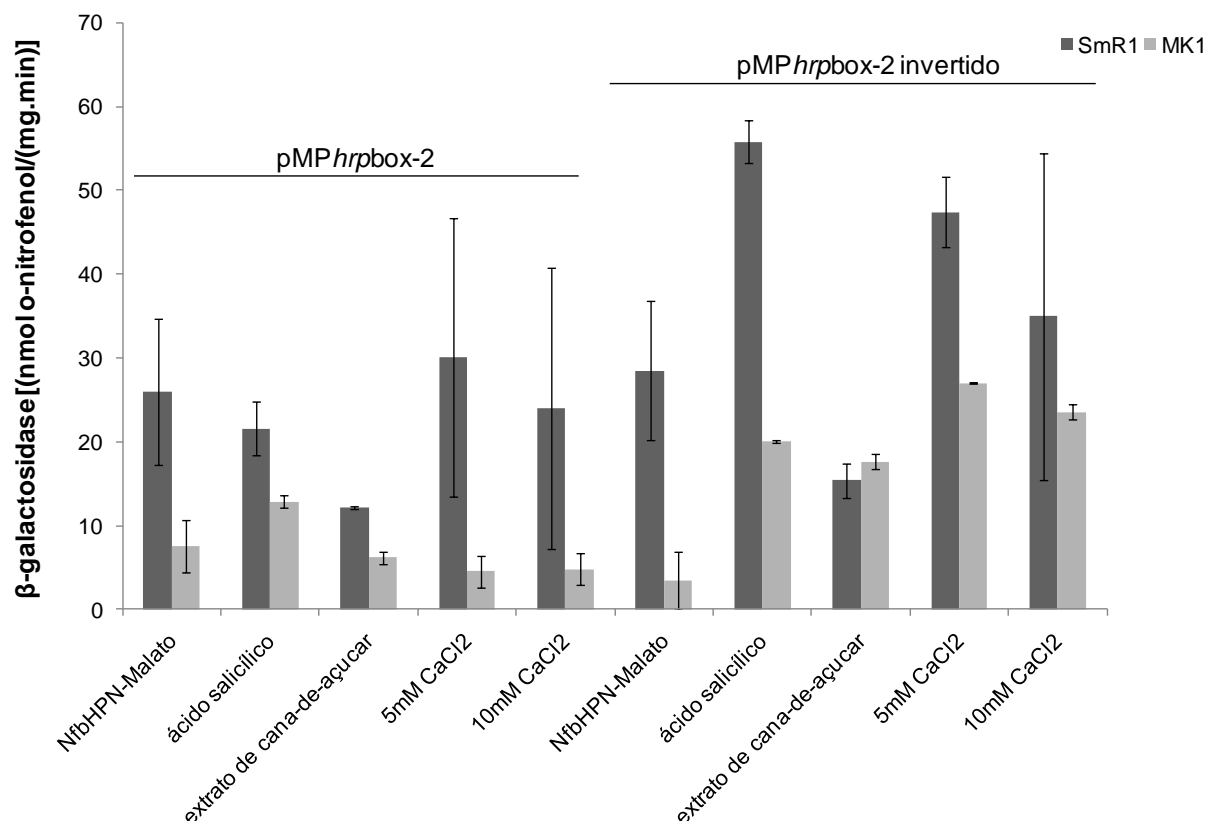
Na figura 14 estão os dados dos experimentos realizados com a fusão pMP*hrp*-box1::lacZ. Em meio mínimo NFbHPN-Malato a expressão desta fusão na estirpe selvagem foi cerca de 10 vezes maior do que na mesma estirpe contendo somente o vetor pMP220. Ainda, a atividade foi 3 vezes maior na estirpe selvagem do que no mutante contendo a mesma fusão. O vetor que contém o inserto na direção inversa teve uma atividade promotora duas vezes menor do que pMP*hrp*-box1::lacZ. O resultado sugere que a ausência de HrpL no mutante causa uma redução da atividade promotora de *hrp*-box1.

Na presença de ácido salicílico não foi observada diferença de expressão da fusão pMP*hrp*-box1::lacZ entre selvagem e mutante, no entanto a expressão do promotor na estirpe mutante foi maior do que no meio mínimo, sugerindo que o

ácido salicílico pode estar ativando outras vias que influenciam a atividade do promotor. A atividade relativamente alta das estirpes contendo o plasmídeo pMP *hrp*-box1invertido::*lacZ* pode indicar a presença de um promotor críptico.

Na presença de extrato de cana-de-açúcar a expressão do promotor *hrp*-box1 em SmR1 selvagem foi um pouco maior se comparada com aquela condição onde há apenas o vetor vazio. Embora a atividade seja baixa a estirpe selvagem apresentou um nível de expressão cerca de 2,5 vezes maior do que a mutante, sugerindo novamente que a ausência de HrpL diminui a atividade promotora *hrp*-box1.

A expressão do promotor *hrp*-box1 foi discretamente maior na presença do que na ausência de 5mM de CaCl<sub>2</sub>. Quando a concentração de CaCl<sub>2</sub> foi aumentada para 10 mM, a expressão do promotor foi cerca de quatro vezes maior no selvagem do que no mutante, sugerindo que CaCl<sub>2</sub> atue como um indutor dos genes *hrp* para *H. seropedicae*.

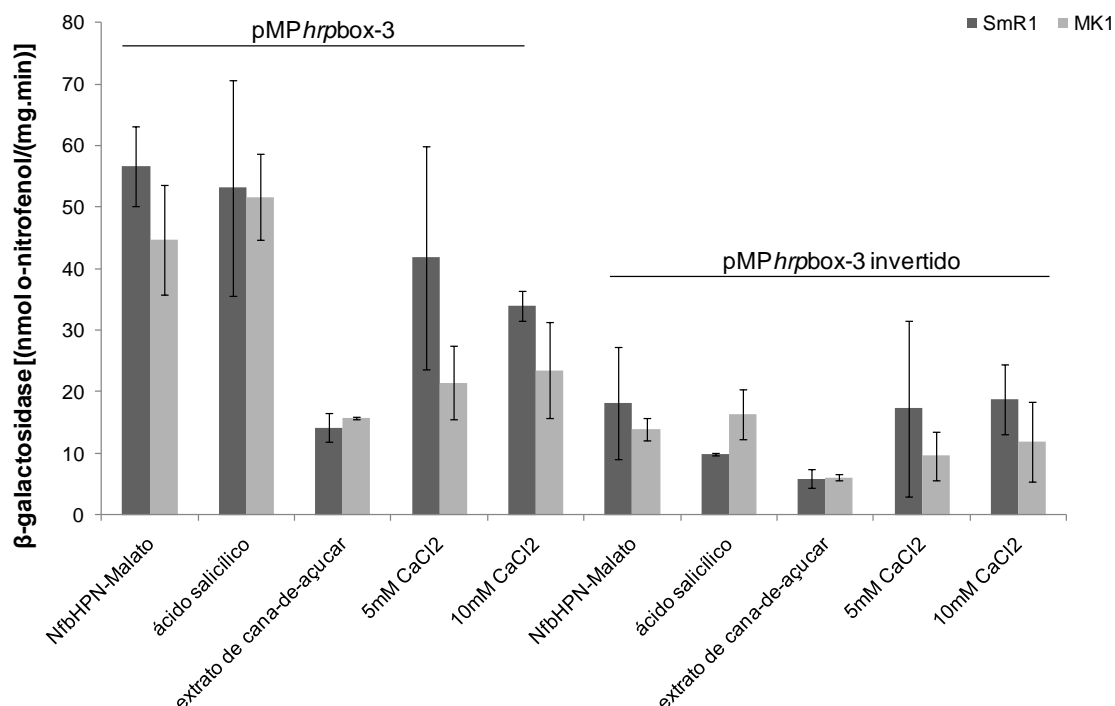


**FIGURA 15:** Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a expressão dos promotores *HrpL*-dependentes das fusões *pMPhrp-box2*, *pMPhrp-box2* invertido inseridas nas estirpes selvagem (SMR1) e mutante *hrpL*<sup>-</sup> (MK1) de *H. seropedicae*.

Os meios utilizados foram: NFbHPN-Malato, NFbHPN-Malato + 10 $\mu$ M de ácido salicílico, NFbHPN-Malato + 10% de extrato de cana-de-açúcar e NFbHPN-Malato contendo 5 ou 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. A atividade de  $\beta$ -galactosidase na estirpe selvagem SmR1 contendo ou não o vetor pMP220 e no mutante MK1 de *H. seropedicae* foi inferior a 4 nmol de o-nitrofenol/ (min.mg proteína). Cada experimento foi feito uma vez em duplicata.

A fusão plasmidial *hrp-box2::lacZ* apresentou atividades de  $\beta$ -galactosidase menores do que a *hrp-box1::lacZ* (Figura 15). Entretanto, a expressão de *pMPhrp-box2::lacZ* em meio mínimo foi quatro vezes maior na estirpe selvagem do que a atividade basal obtida nesta mesma estirpe contendo o vetor pMP220. Além disso, como para o promotor *hrp-box1*, no meio mínimo a expressão de *pMPhrp-box2::lacZ* foi maior na selvagem do que no mutante. Novamente, houve expressão aparentemente regulada de *pMPhrp-box2invertido::lacZ*, tanto no meio mínimo, como no meio mínimo adicionado dos composto. É possível que estes resultados conflitantes sejam reflexo da atividade extremamente baixa deste promotor, o que impede uma conclusão.

A adição de indutores externos ao meio mínimo não causou aumento da expressão de pMP*hrp*-box2::*lacZ*.



**FIGURA 16:** Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a expressão dos promotores HrpL-dependentes das fusões pMP*hrp*-box3, pMP*hrp*-box3 invertido inseridas nas estirpes selvagem (SMR1) e mutante *hrpL*<sup>-</sup> (MK1) de *H. seropedicae*.

Os meios foram: NFbHPN-Malato, NFbHPN-Malato + 10μM de ácido salicílico, NFbHPN-Malato + 10% de extrato de cana-de-açúcar e NFbHPN-Malato contendo 5 ou 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. A atividade de β-galactosidase na estirpe selvagem SmR1 contendo ou não o vetor pMP220 e no mutante MK1 de *H. seropedicae* foi inferior a 4 nmol de o-nitrofenol/ (min.mg proteína). Cada experimento foi feito uma vez em duplicata.

A expressão da fusão pMP*hrp*-box3::*lacZ*, assim como ocorreu com o promotor *hrp*-box1, no meio mínimo foi 10 vezes maior do que a observada nas células que continham somente o vetor pMP220 vazio (Figura 16). No entanto, não foi observada diferença de expressão entre estirpe selvagem e mutante cultivadas em meio mínimo ou na presença de ácido salicílico e extrato de cana-de-açúcar. Por outro lado na presença de 5 mM de CaCl<sub>2</sub> a atividade promotora na estirpe selvagem foi cerca de duas vezes maior do que no mutante. Este resultado sugere,

como no caso do promotor *hrp*-box1, que o  $\text{CaCl}_2$  pode estar desempenhando um papel de indutor de genes *hrp* em *H. seropedicae*.

Juntos, os resultados sugerem que íons cálcio possivelmente agem como um indutor de expressão dos genes *hrp* de *H. seropedicae*. Mudanças na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular podem alterar a estabilidade e atividade de várias enzimas, assim  $\text{Ca}^{2+}$  pode atuar como regulador metabólico (MICHIELS *et al.*, 2002). Em condições naturais, *H. seropedicae* poderia entrar em contato com íons de cálcio do apoplasto da planta, onde sua concentração varia de 1 a 10 mM (JONES *et al.*, 1999). Apesar de o ácido salicílico ser um regulador negativo da produção de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e também afetar a adesão e a formação de biofilme bacteriano em concentrações que não inibem o crescimento desta bactéria, no presente estudo não foi observada nenhum tipo de resposta à presença deste composto fenólico no meio de cultivo das bactérias. No entanto, novos ensaios são necessários para se chegar a uma conclusão. Em *Dickeya dadanti* (também conhecida como *Erwinia chrysanthemi*) foi relatado que dois compostos fenólicos, ácido *o*-cumárico e ácido *t*-cinâmico, derivados da via biossintética do ácido salicílico são responsáveis por ativar alguns genes *hrp* (YANG *et al.*, 2008).

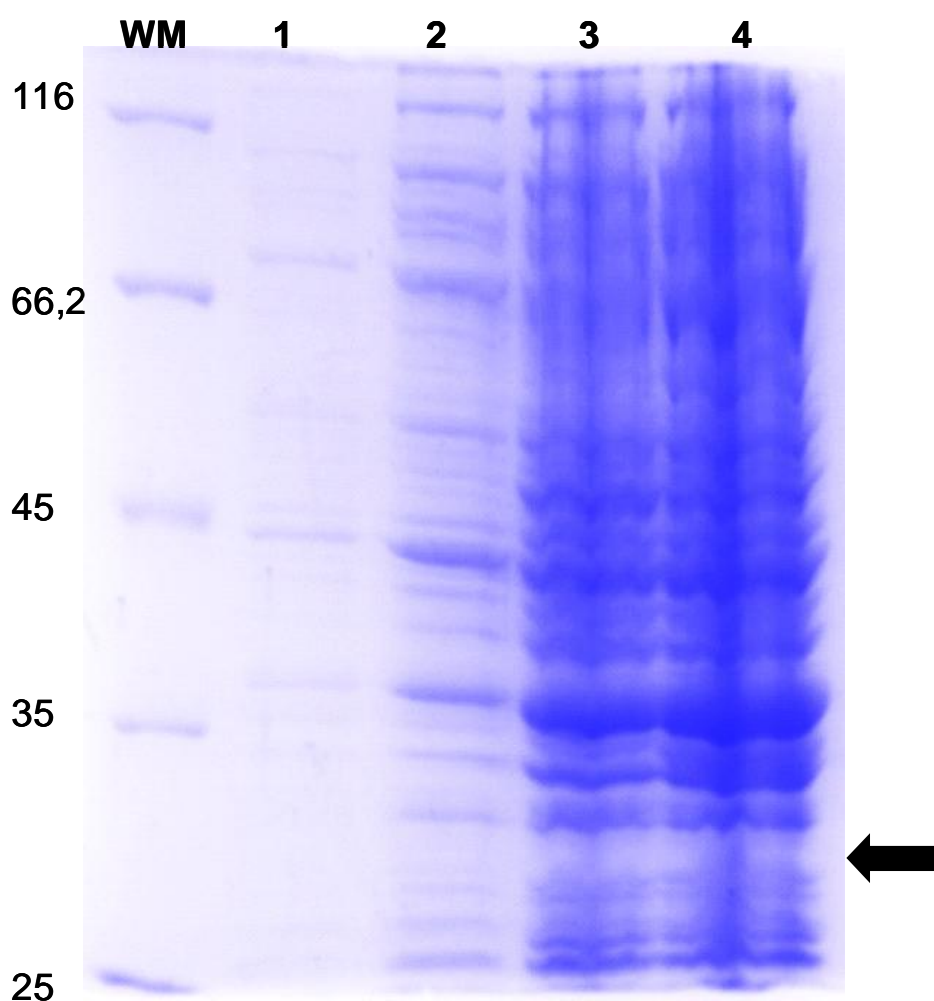
#### 5.4 SUBCLONAGEM DO GENE *hrpL* E EXPRESSÃO DOS PROMOTORES *HrpL*-DEPENDENTES EM *Escherichia coli*.

XIAO e colaboradores (1994) mostraram em *P. aeruginosa* a indução de promotores *hrp*-box por *HrpL*, utilizando estirpes que continham as construções dos promotores e plasmídeos contendo o gene *hrpL* induzível.

O plasmídeo pDK7-*HrpL* expressando a proteína *HrpL* de *H. seropedicae* e os plasmídeos pMP*hrp*-box1 e pMP*hrp*-box1 invertido, pMP*hrp*-box2 e pMP*hrp*-box2 invertido e pMP*hrp*-box3 e pMP*hrp*-box3 invertido, foram introduzidos por transformação em *E. coli* estirpe DH10B. A expressão da proteína *HrpL* foi induzida por 1mmol/L de IPTG em meio LB e as culturas foram incubadas a 20°C, uma vez que em alguns organismos a expressão de genes *hrp* é induzida a baixa temperatura sugerindo que proteínas envolvidas na sua expressão possam ser sensíveis a temperatura. Considerando que a atividade de  $\beta$ -galactosidase obtida foi

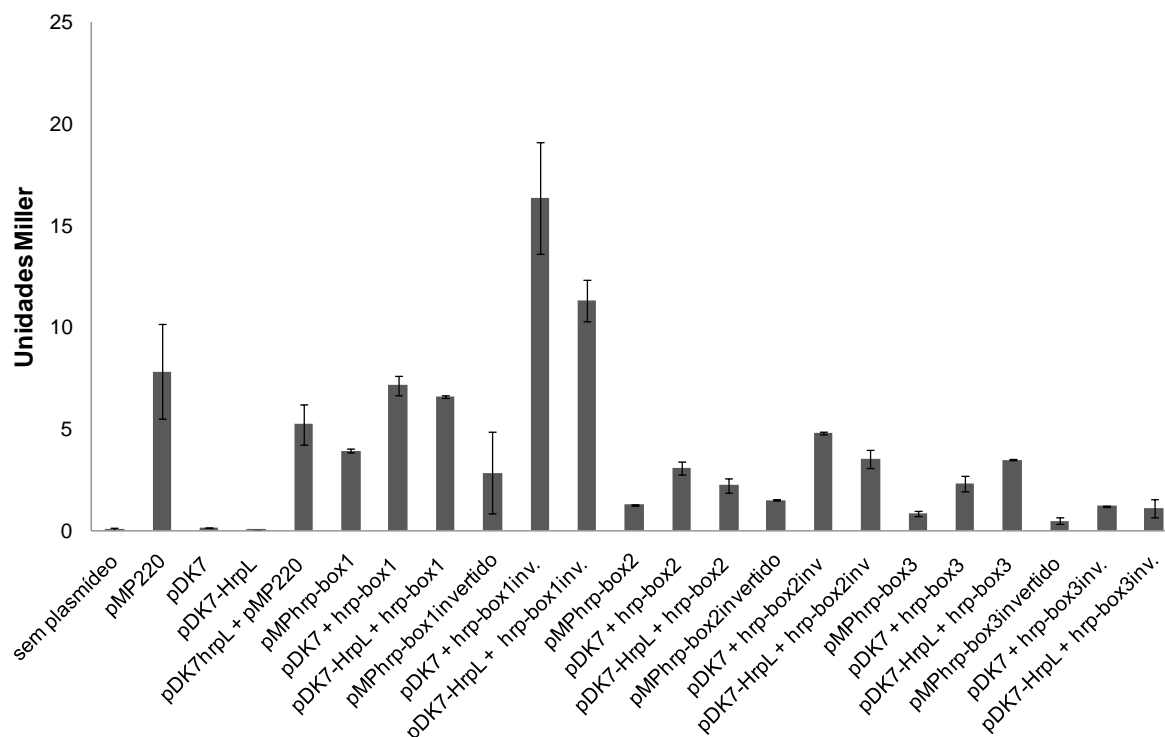


muito baixa (de 10 a 16 unidades Miller) concluiu-se que os prováveis promotores não foram ativados nas condições testadas (Figura 18). A expressão da proteína HrpL foi confirmada por eletroforese SDS-PAGE (Figura 17), porém não sabemos se a proteína estava sendo expressa na sua forma ativa ou em quantidades suficiente para ativar os promotores.



**FIGURA 17:** Expressão de HrpL em *E. coli* DH10B contendo o plasmídeo pDK7-HrpL e induzida com 1mM de IPTG.

Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% e tampão Tris-Glicina corado com Comassie blue R250. MW = marcador de massa molecular (kDa). Linha 1 e 2: Extrato celular de *E. coli* contendo o vetor pDK7 e o vetor pDK7 HrpL, respectivamente, sem adição de IPTG. Linha 3 e 4: Extrato celular de *E. coli* DH10B contendo o vetor pDK7 vazio e pDK7-HrpL, respectivamente, com adição de 1 mM de IPTG e incubada a 20°C por 16 horas.



**FIGURA 18: Expressão dos promotores HrpL-dependentes em *E. coli* DH10B expressando a proteína HrpL.**

Os controles negativos do experimento foram: culturas de *E. coli* DH10B sem vetor, contendo o vetor pMP220, contendo o vetor pDK7 ou contendo o plasmídeo pDK7-HrpL e o plasmídeo pMP220. O pré-inóculo das culturas foram feitos a 30°C, a expressão da proteína HrpL a 20°C. Foram feitos dois experimentos em duplicata.

## 5.5 CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *hrpL*

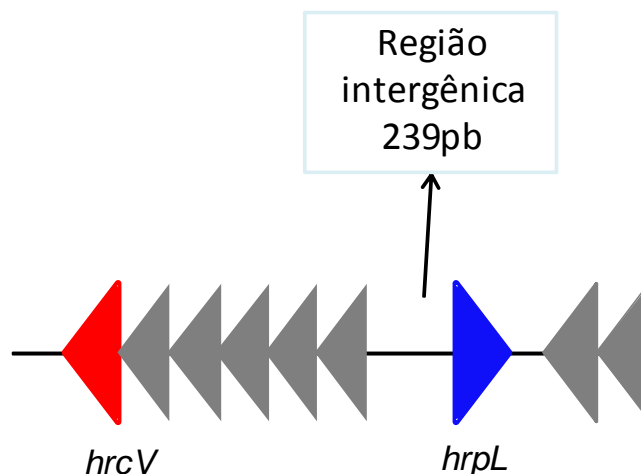
Os genes *hrp* do grupo I em *Erwinia spp*, *Pantoea stewartii*, e *P.syringae* são regulados por HrpL. A indução de *hrpL* em *Erwinia spp*. e *Pantoea stewartii* requer o produto de *hrpS*; já em *P. syringae* são necessários os produtos de *hrpS* e de *hrpR* (HUTCHESON et al., 2001; MERIGHI et al., 2003).

Em *H.seropedicae* o gene *hrpL* está invertido em relação aos demais genes *hrp*. Para tentar elucidar a regulação de *hrpL*, a região intergênica entre uma orf hipotética e o gene *hrpL* (Figura 19) foi amplificada a partir do DNA genômico da estirpe SmR1 (item 4.11), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *hrpLintergenicForward* CTGCAGTTTGAAGGAAGCCATGATG (contem sítio PstI) e *hrpLintergenicReverso* AGATCTCGCTTGCTTGCATGTGA (contem sítio BglII). A

figura 20 mostra o produto de amplificação obtido contendo 324 pb (item 4.10). Para a amplificação deste fragmento foram utilizados tampão de amplificação 1X (*Taq* Buffer -FERMENTAS®) contendo KCl (Figura 20, linhas 2 e 3) e tampão de amplificação 1X (*Taq* Buffer -FERMENTAS®) contendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 20, linha 4). Comparando os amplificados pode-se observar que a condição que proporcionou uma maior quantidade de produto amplificado foi na presença do tampão contendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este fragmento foi purificado e clonado no vetor comercial pTZ57R/T, produzindo o plasmídeo pTZ*hrpL*intergenic.

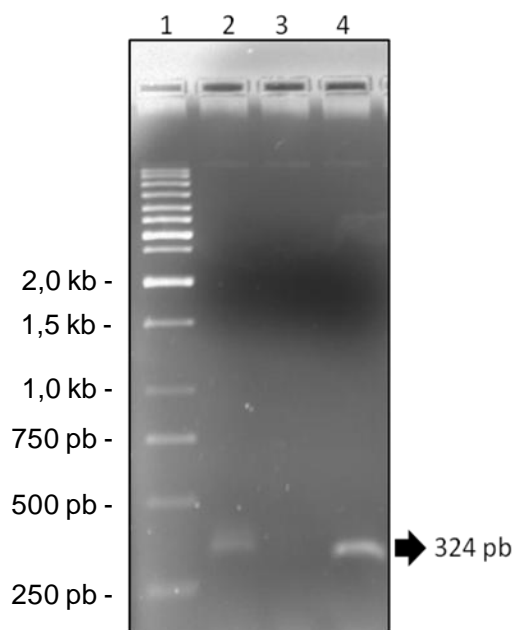
O inserto deste plasmídeo foi sequenciado para confirmar a identidade do promotor *hrpL* e, então, transferido como um fragmento PstI-BglII para os vetores de fusão pPW452 e pMP220, produzindo os plasmídeos pPW452*hrpL*intergenic e pMP220*hrpL*intergenic. A identidade da sequência da região intergênica *orf-hipotética/hrpL* foi confirmada pelo sequenciamento dos insertos dos plasmídeos pMP220*hrpL*intergenic e pPW452*hrpL*intergenic utilizando como iniciadores os oligonucleotídeos usados para a amplificação da região intergênica *orf-hipotética/hrpL*.

O fragmento foi clonado nos vetores pMP220 e pPW452 para que fossem obtidos plasmídeos com o inserto nas duas orientações distintas, sendo que uma delas corresponde a direção do gene *hrpL*, pMP220, ou seja, poderá ser utilizado para estudar a expressão de *hrpL* e na direção inversa, pPW452, permitindo estudar a expressão de genes hipotéticos e do gene *hrcV* (Figura 19) de *H. seropedicae*. Estas construções foram introduzidas nas estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem e mutante MK1 e utilizadas nos ensaios de atividade β-galactosidase.



**FIGURA 19:** Esquema representativo da região intergênica *orf-hipotética/hrpL*.

Fragmento de 324pb amplificado a partir de DNA genômico da região intergênica *orf-hipotética/hrpL* correspondente ao promotor do gene *hrpL*.



**FIGURA 20:** Perfil eletroforético do produto de PCR para obtenção da região promotora do gene *hrpL* em gel de agarose 1% e tampão TBE 1X.

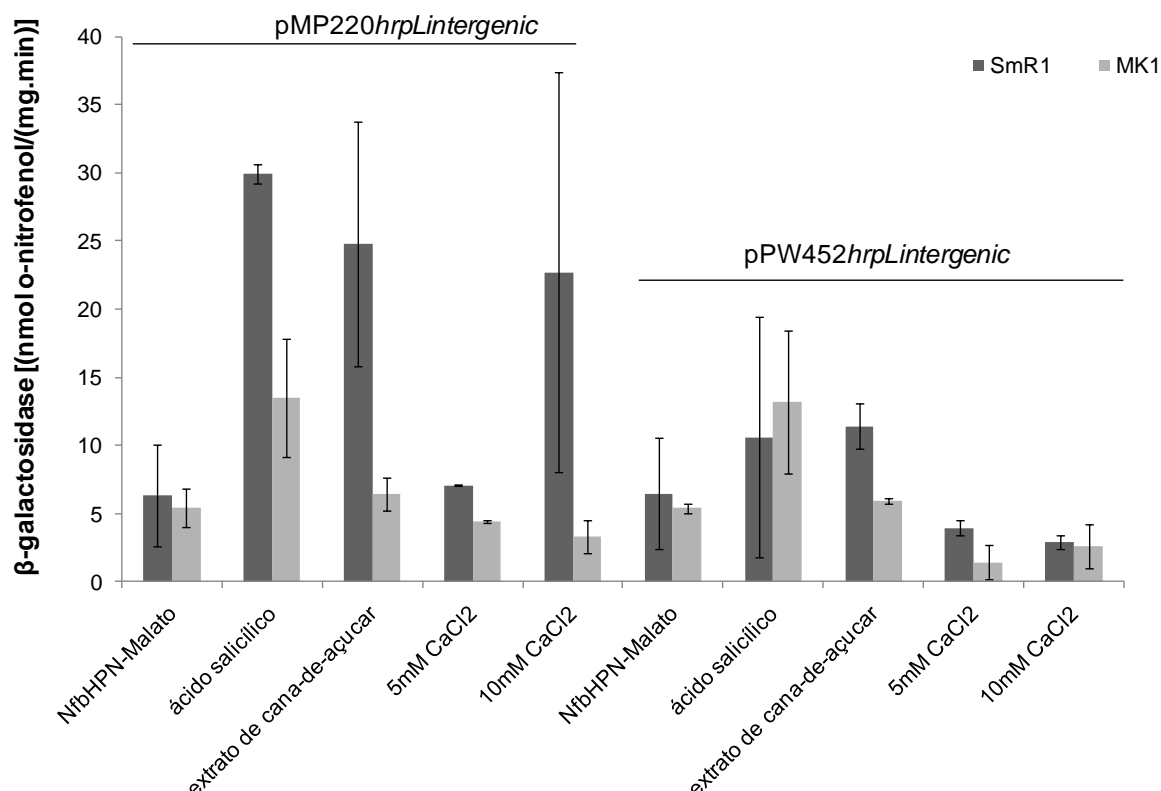
Linha 1: marcador de peso molecular. Linha 2 e 3: produto de PCR utilizando o tampão *Taq Buffer* + KCl 1X. Linha 4: produto de PCR utilizando o tampão *Taq Buffer* +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1X. O DNA molde utilizado para esta amplificação foi obtido como descrito no item 4.11 e a reação de PCR foi feita como descrito no item 4.10. O programa para a amplificação consistiu dos seguintes passos: 94°C-5' um ciclo; 94°C-2', 59°C-45 seg. e 72°C - 1min e 30 seg. 30 ciclos; e 72°C-2' um ciclo.

## 5.6 EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO GENE *hrpL* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE INDUÇÃO EM *Herbaspirillum seropedicae*

Em *P. syringae*, sob condições de indução, HrpR e HrpS formam um heterodímero que se associa ao promotor *hrpL* para estimular a transcrição de *hrpL* pela interação com a holoenzima RpoN-RNA polimerase (HUTCHESON *et al.*, 2001). Outros reguladores de *hrpL* foram relatados em *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, incluindo o sistema RsmA/rsmB, que consiste em um sistema de regulação pós-transcricional mediado por RNA (CHATTERJEE *et al.*, 2002). RsmA é uma pequena proteína ligadora de RNA que promove o decaimento de RNA (CHATTERJEE *et al.*, 1995). O RNA *rsmB*, por outro lado, atua como regulador positivo, sequestrando RsmA (LIU *et al.*, 1998). Em *H. seropedicae* não é encontrado promotor reconhecido por  $\sigma^{54}$  ou sítios de ligação de proteínas ativadoras. RsmA também não está presente neste organismo, assim não sabemos o que regula o ativador *hrpL* de *H. seropedicae*.

Para estudar a atividade promotora da região intergênica *orf-hipotética/hrpL*, as estirpes selvagem SmR1 e mutante MK1 (*hrpL*<sup>-</sup>) contendo os plasmídeos, pMP220*hrpL*intergenic e pPW452*hrpL*intergenic foram incubadas em quatro condições de cultivo. Posteriormente, ensaios de atividade  $\beta$ -galactosidase foram realizados para verificar a expressão dos prováveis promotores (Figura 21).

As condições de cultivo para testar a expressão foram: a) meio NFbHPN-Malato; b) meio NFbHPN-Malato contendo 10% de extrato de cana-de-açúcar; c) 10 $\mu$ M de ácido salicílico; d) 5 ou 10 mM de CaCl<sub>2</sub>.



**FIGURA 21:** Efeito de diferentes condições de cultivo sobre a expressão de promotor do gene *hrpL* das fusões pMP220*hrpLintergenic* e pPW452*hrpLintergenic* inseridas em estirpes selvagem e mutante MK1 de *H. seropedicae*.

Os meios utilizados foram: NFbHPN-Malato, NFbHPN-Malato + 10μM de ácido salicílico, NFbHPN-Malato + 10% de extrato de cana-de-açúcar e NFbHPN-Malato contendo 5 ou 10mM de CaCl<sub>2</sub>.

As atividades estão expressas em nmol de o-nitrofenol por miligrama de proteína por minuto de reação [nmol o-nitrofenol/(mg.min)]. A determinação da atividade de β-galactosidase foi feita como descrito no item 4.15. Os experimentos foram feitos uma vez em duplicata. As condições controle deste ensaio foram as estirpes SmR1 selvagem e mutante MK1 contendo ou não o vetor pMP220 vazio e suas atividades de β-galactosidase foram inferiores a 4 nmol de o-nitrofenol/(min.mg proteína).

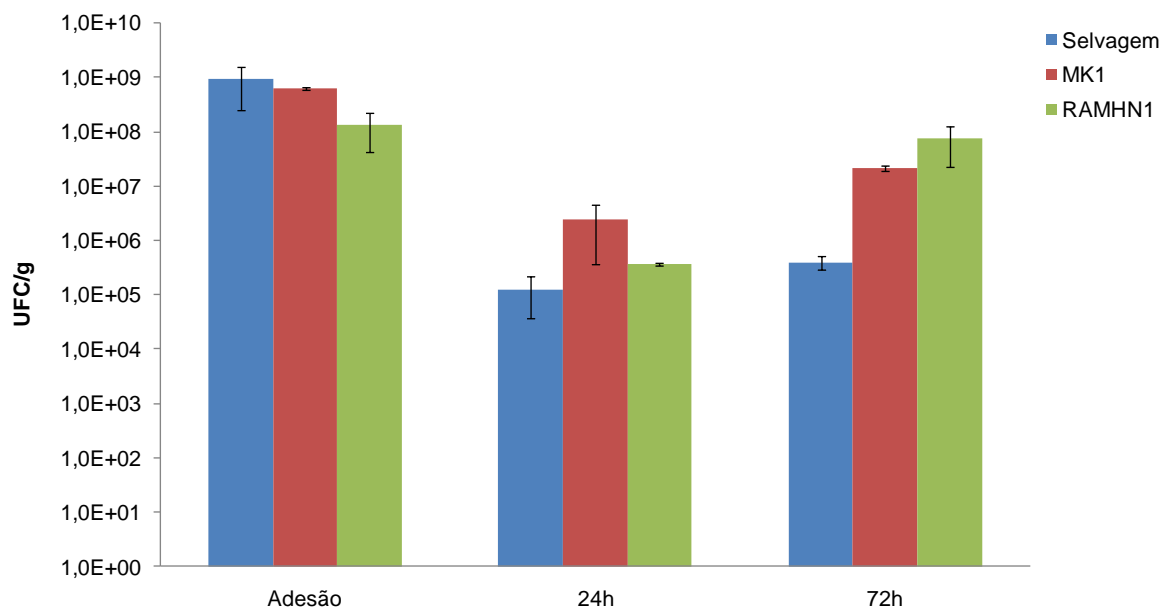
A estirpe selvagem contendo pMP220*hrpLintergenic* crescida em meio mínimo NFbHPN-Malato apresentou uma atividade de β-galactosidase de cerca de 6 nmol o-nitrofenol/(mg.min). A adição de ácido salicílico (10μM), extrato de cana-de-açúcar (10%) ou cloreto de cálcio (5 ou 10mM) ao meio mínimo causou um aumento na atividade para aproximadamente 30 nmol o-nitrofenol/(mg.min). A atividade de pPW452*hrpLintergenic*::LacZ foi menor que em pMP220*hrpLintergenic*::LacZ mas

como as atividades foram baixas conclui-se que não foi observada expressão do promotor do gene *hrpL*, nem do gene *hrcV*. As condições controle deste ensaio foram as estirpes SmR1 selvagem e mutante MK1 contendo ou não o vetor pMP220 vazio e suas atividades de  $\beta$ -galactosidase foram inferiores a 4 nmol de o-nitrofenol/(min.mg proteína). No presente trabalho mesmo com um pequeno aumento na atividade de  $\beta$ -galactosidase nos meios indutores a atividade de pMP220*hrpL* intergenic foi muito baixa para elaborar qualquer hipótese sobre a regulação de HrpL.

#### 5.7 CAPACIDADE DE ADESÃO E COLONIZAÇÃO DAS ESTIRPES SELVAGEM E MUTANTES RAMHN1 (*hrcN*) e MK1 (*hrpL*<sup>-</sup>).

O sistema de secreção do tipo III é utilizado por várias bactérias na interação com o hospedeiro. Acredita-se que este sistema possa estar envolvido na interação planta-*H. seropedicae* já que os genes que codificam os componentes deste sistema estão presentes no genoma de *H. seropedicae*. Para estudar o efeito da mutação do gene *hrpL* na capacidade de *H. seropedicae* interagir com a planta, ensaios de adesão e colonização de raízes foram feitos conforme descrito no item 4.17, utilizando como modelos vegetais o arroz BRS FORMOSO (*Oryza sativa*) e o milho SHS 3031 (*Zea mays*). Foram utilizadas duas espécies vegetais, pois os fatores que influenciam a indução do SST3 diferem entre os patógenos e entre as condições apoplásticas de diferentes espécies hospedeiras (TANG *et al.*, 2006).

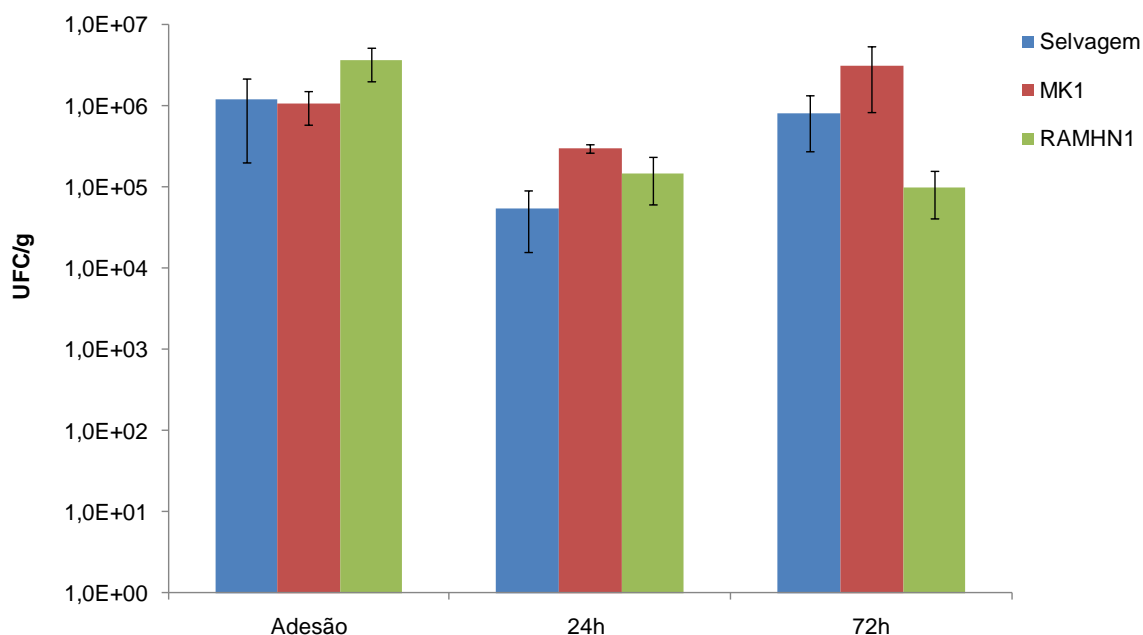
Tanto em arroz como em milho foram inoculadas as estirpes SmR1 selvagem, MK1 (*hrpL*<sup>-</sup>) e também a estirpe RAMHN1 (*hrcN*) para verificar se a mutação no gene que codifica para HrcN, a ATPase do aparato de translocação, também poderia afetar a capacidade de colonização da bactéria. A contagem de bactérias dos ensaios de colonização foram feitas após 24 horas e 72 horas do inóculo. Na figura 22 estão demonstrados os dados obtidos no experimentos de adesão e colonização em arroz e na figura 23 em milho.



**FIGURA 22: Adesão e colonização de plantas de arroz pelas estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem, MK1 e RAMHN1.**

Foram realizados dois ensaios independentes de adesão e colonização endofítica em triplicata e foram feitas diluições seriadas para a contagem de unidades formadoras de colônias. A colonização endofítica foi analisada após 24h e 72h após inoculação. Os resultados são expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de raiz fresca.





**FIGURA 23: Adesão e colonização de plantas de milho pelas estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem, MK1 e RAMHN1.**

Os ensaios de adesão e colonização foram feitos uma vez em quintuplicata. E foram feitas diluições seriadas para a contagem de unidades formadoras de colônias. A colonização endofítica foi analisada após 24h e 72h após inoculação. Os resultados são expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de raiz fresca.

Os resultados mostram que as estirpes selvagem e mutantes *hrpL*<sup>-</sup> e *hrcN* não apresentaram diferença na capacidade de adesão, no entanto, a adesão nas raízes de arroz parece ter sido mais eficiente já que houve um maior número de unidades formadora de colônias (UFC) do que em plantas de milho. Este resultado precisa ser confirmado devido à variabilidade deste ensaio.

O padrão de colonização das estirpes inoculadas foi semelhante nas duas espécies vegetais, milho e arroz. Entretanto, após 24 horas foi observado um maior número de células das estirpes mutantes colonizando endofiticamente ambas as plantas. Após 72 horas, o número de UFC em raízes de arroz superficialmente esterilizadas era maior quando inoculadas com as estirpes mutantes. Recentemente foi observado que em *Pseudomonas aeruginosa* existe um controle cruzado negativo entre proteínas do SST3 e as envolvidas na montagem do flagelo, sendo que a motilidade e/ou a montagem do flagelo são antagonistas ao SST3. Em estirpes sem flagelo, a expressão dos genes do sistema de secreção tipo III está

aumentada, enquanto que a expressão de genes de proteínas do flagelo e a motilidade estão diminuídas em uma estirpe superexpressando ExsA, um regulador do SST3 (SOSCIA *et al.*, 2007). Portanto, é possível que nas estirpes mutantes MK1 e RAMHN1, a ausência de um SST3 funcional tenha induzido a expressão e/ou modificações de proteínas do aparato do flagelo alterando a mobilidade da bactéria e conferindo maior capacidade de colonização. A análise proteômica do mutante RAMHN1 por CHAVES (2008) mostrou síntese aumentada de componentes do flagelo (FliC, FliD e FlaG). Os resultados levaram à hipótese de que a síntese destas proteínas seria provavelmente decorrente da não funcionalidade do sistema tipo III desta estirpe. O flagelo é um importante fator de virulência para patógenos de animais e plantas. Tendo em vista que a maior parte das bactérias que se associam a plantas são móveis, a quimiotaxia dirigida pelo flagelo é importante na interação inicial com o hospedeiro, particularmente na rizosfera (GÓMEZ-GÓMEZ & BOLLER, 2002; FELIX *et al.*, 1999).

Embora mutações no SST3 deveriam, em princípio, alterar negativamente a interação planta-bactéria, uma vez que este sistema injeta as proteínas efetoras que contribuem para a invasão da bactéria no tecido vegetal, a mutação de SST3 de *Rhizobium* NGR234 produz efeitos opostos dependendo do hospedeiro: mutação no SST3 de *Rhizobium* NGR234 não altera a interação com *Leucaena leucocephala*, *Vigna unguiculata* e *Lotus japonicus*; afeta negativamente interação com *Crotalaria juncea*, *Phaseolus vulgaris* e *Pachyrhizus tuberosus*; afeta positivamente interação com *Tephrosia vogelii*, *Flemingia congesta* e *Lablab purpureus* (DEAKIN & BROUGHTON, 2008). É possível portanto que a mutação do sistema de secreção do tipo III de *H. seropedicae* possa afetar positivamente a interação com alguns de seus hospedeiros.

É importante ainda notar que a diferença numérica de UFC observada nos experimentos de inoculação de *H. seropedicae*, estirpes selvagem e mutantes do SST3, é pequena e repetições deste ensaios devem ser feitas juntamente com uma análise estatística para se obter dados robustos. Também podem ser feitos ensaios de motilidade destes mutantes para obter resultados confiáveis e confirmar as diferenças de colonização e motilidade destas estirpes.

## 5.8 INFILTRAÇÃO DE CULTURAS *H. seropedicae*, EXPRESSANDO A PROTEÍNA AvrPtoB, NO MODELO VEGETAL TOMATE CV MICRO-TOM.

As proteínas efetoras liberadas pelo sistema de secreção do tipo três são responsáveis por promover a virulência de bactérias patogênicas em plantas e animais. Existe uma grande diversidade de efetores nos diferentes patógenos, os quais são baseados na comparação de sequências e podem ter atividades enzimáticas diversas como proteases, ligases e fosfatases (CHANG, 2005). Mais de 30 efetores são entregues pelo SST3 de *Pseudomonas syringae* (pv.) *tomato* (PETNICKI-OCWIEJA *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2005). A proteína efetora AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* é secretada pelo sistema do tipo III e induz resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas de tomate que possuem a proteína de resistência Pto ou em plantas não-hospedeiras como soja e tabaco (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006).

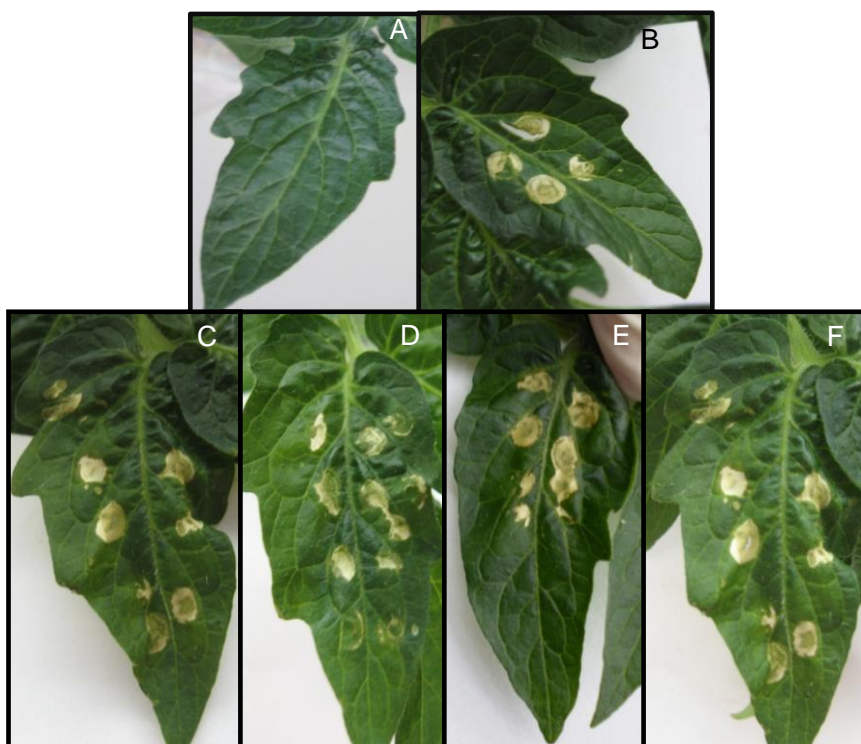
Em tomateiro, AvrPto contribui para a virulência da bactéria e aparecimento de resposta hipersensitiva (HR) (SHAN *et al.*, 2000). A proteína de resistência do tomateiro Pto, uma quinase citoplasmática, reconhece as efetoras AvrPto e AvrPtoB com as quais interage dentro da célula do hospedeiro e confere resistência contra a infecção por *P. syringae* (XIAO *et al.*, 2007). Em plantas susceptíveis não ocorre aparecimento de HR, mas sim o aparecimento de sintomas típicos de doença, já em *Arabidopsis* esta proteína suprimiu a defesa basal da planta (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006). Além disso, TANG e colaboradores (1996) demonstraram a indução de resposta de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco inoculadas com *Agrobacterium* EHA105 expressando a proteína AvrPtoB de *P. syringae*.

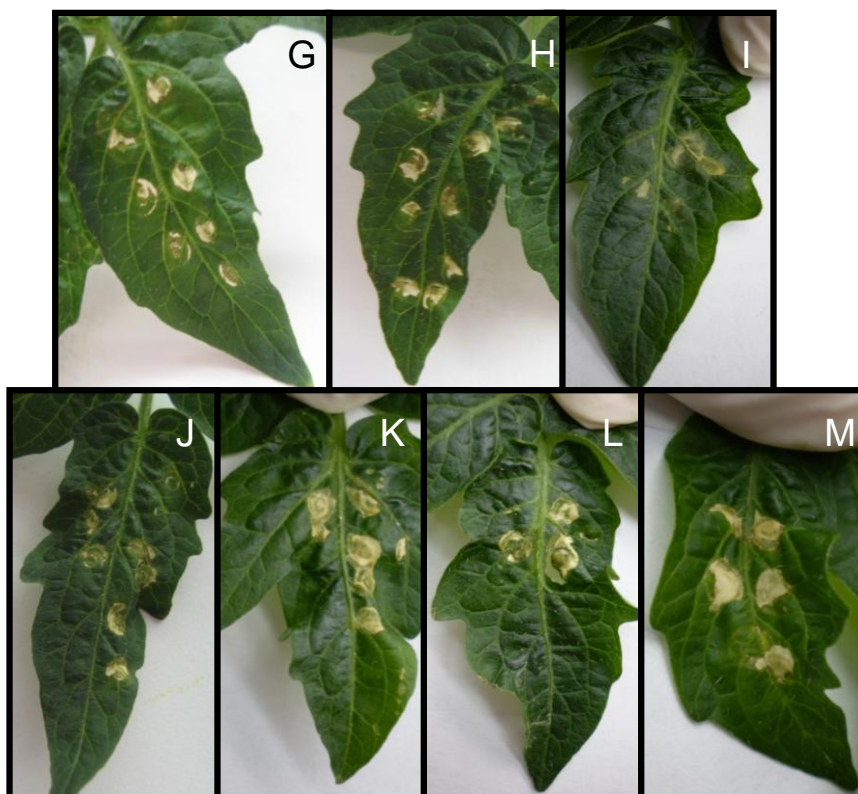
Para verificar a funcionalidade do sistema de secreção do tipo III de *H. seropedicae* *in vivo*, o vetor pLAFR3.18 e os plasmídeos, pLAFR-PsPto e pDSK519-173, que contém o gene que codifica para a proteína AvrPtoB de *P. syringae*, foram conjugados com as estirpes selvagem, SmR1 e nos mutantes MK1 e RAMHN1, as quais foram infiltradas em plantas de tomateiro Micro-Tom como descrito no item 4.20. Após infiltração, as plantas foram acompanhadas durante 15 dias para o aparecimento de resposta hipersensitiva. O controle negativo para infecção foi uma solução de sulfato de magnésio 10 mM, a qual foi infiltrada na planta nas mesmas condições que as culturas. A Figura 24 mostra as folhas infiltradas após 15 dias de

tratamento. Para saber se as bactérias de interesse estavam presentes, as folhas tratadas foram trituradas e contou-se a quantidade de unidades formadoras de colônias (dados não mostrados). Com isso, foi detectada a presença destas bactérias nas folhas, mostrando que elas estavam presentes na planta.

CHAVES em 2008 mostrou que as estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem e mutante RAMHN1 contendo um plasmídeo expressando a proteína AvrPtoB de *P. syringae*, causaram sintomas tipo lesão molhada, necrose e clorose quando inoculadas em folhas de tomateiro gigante. A infiltração destas mesmas bactérias em tomateiro micro-tom não ocasionou sintomas semelhantes aos observados por CHAVES. As lesões aparentes nas folhas podem ser devido ao método utilizado para inocular as culturas, uma vez que ocorrem do mesmo modo no controle e nos tratamentos (Figura 24).

Normalmente, homólogos do mesmo efector são usados por diferentes patógenos. Mas, se o sistema de secreção vai facilitar ou não a simbiose depende da planta e da bactéria. Em *Leucaena leucocephala* tanto *Rhizobium sp.* NGR234 selvagem quanto o mutante no SST3 apresentam o mesmo fenótipo de colonização. Por outro lado, a secreção de algumas proteínas em *M. lottii* teve que ser abolida para que ocorresse o desenvolvimento de nódulo em *L. leucocephala* (HUBBER, *et al.* 2004).





**FIGURA 24:** Fotos das folhas de tomate Micro-Tom inoculadas com as estirpes de *H. seropedicae* SmR1.

(A) Saudável, (B) Controle 10 mM MgSO<sub>4</sub>, (C) estirpe SmR1 selvagem, (D) estirpe SmR1 selvagem contendo o vetor pLAFR3.18, (E) estirpe SmR1 selvagem contendo o plasmídeo pLAFR-PsPto, (F) estirpe SmR1 selvagem contendo o plasmídeo pDSK519-173, (G) estirpe mutante SmR1 MK1, (H) estirpe mutante SmR1 MK1 contendo o vetor pLAFR3.18, (I) estirpe mutante SmR1 MK1 contendo o plasmídeo pLAFR-PsPto, (J) estirpe mutante SmR1 RAMHN1, (K) estirpe mutante SmR1 RAMHN1 contendo o vetor pLAFR3.18, (L) estirpe mutante SmR1 RAMHN1 contendo o plasmídeo pLAFR-PsPto, (M) estirpe mutante SmR1 RAMHN1 contendo o plasmídeo pDSK519-173.

## 6 CONCLUSÕES

- A mutação do gene *hrpL* na estirpe *MK1* de *H. seropedicae* foi confirmada por reação de PCR.
- Os promotores *hrp-box1*, *hrp-box2* e *hrp-box3* foram subclonados no vetor de fusão pMP220 em ambas as orientações.
- Os meios indutores de genes *hrp* para *X. oryzae pv. oryzae* XOM1 e XOM2 não induziram a expressão dos promotores HrpL-dependentes de *H. seropedicae*.
- O gene que codifica para a proteína HrpL foi subclonado no vetor pDK7.
- A proteína HrpL de *H. seropedicae* não foi capaz de ativar a expressão de *hrp-box1*, *hrp-box2* e *hrp-box3* em *E. coli*.
- As atividades obtidas nos ensaios de  $\beta$ -galactosidase com as fusões contendo os promotores *hrp-box1*, *hrp-box2* e *hrp-box3* foram baixas. No entanto, a expressão dos promotores *hrp-box1* e *hrp-box2* foi diminuída no mutante *hrpL*. E a expressão do promotor *hrp-box3* foi semelhante na estirpe selvagem e mutante *hrpL*<sup>-</sup> de *H. seropedicae*.
- Um fragmento contendo o promotor do gene *hrpL* foi amplificado com *primers* específicos e clonado nos vetores de fusão pMP220 e pMP452.
- Os níveis de expressão do promotor da região *hrpLintergenic* foram baixos e não foi possível identificar uma condição de indução do promotor do gene *hrpL*.
- Íons  $\text{Ca}^{+2}$  aparentemente atuam como indutores da expressão dos promotores *hrp-box1*, *hrp-box2* e *hrp-box3*

- As estirpes mutantes MK1 (*hrpL*<sup>-</sup>) e RAMHN1 (*hrcN*) de *H. seropedicae* apresentaram um fenótipo de adesão e colonização endofítica de raízes de plântulas de milho semelhante ao da estirpe selvagem
- As estirpes mutantes MK1 e RAMHN1 apresentaram maior capacidade de colonização em plântulas de arroz após 24 e 72h da inoculação, e é possível que nas estirpes mutantes MK1 e RAMHN1, a ausência de um SST3 funcional tenha induzido a expressão e/ou modificações de proteínas do aparato do flagelo contribuindo para a mobilidade da bactéria conferindo maior capacidade de colonização. No entanto, são necessários ensaios de motilidade para confirmar qualquer hipótese.
- A infiltração de folhas de tomateiros cv. Micro-Tom com as estirpes SmR1 e RAMHN1 de *H. seropedicae* contendo plasmídeos que expressam a proteína AvrPtoB de *P. syringae* não causou resposta hipersensitiva

## REFERÊNCIAS

- ABRAMOVITCH, R. B., ANDERSON, J.C. e MARTIN, G. B. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature* , 7, pp. 601-611.
- AGRAIN, C., SORG, I., PAROZ, C. e CORNELIS, G. R. (2005). Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Mol. Microbiol.* , 57, pp. 1415–1427.
- ALDON, D., BRITO, B., BOUCHER, C. e GENIN, S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* , 19, pp. 2304–2314.
- ALEGRIA, M. C., DOCENA, C., KHATER, L., RAMOS, C. H., DA SILVA, A. C., e FARAH, C. S. (2004). New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the pathogen *Xanthomonas axonodopsis* pathovar *citri*. *Journal of Bacteriology* , 186, pp. 6186–6197.
- ALFANO, J. R. & COLLMER, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* , 8, pp. 1683–1698.
- ALFANO, J. R., & COLLMER, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* , 179, pp. 5655-5662.
- ANDERSON, D. M. & SCHNEEWIND, O. (1997). A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* , 278, pp. 1140–1143.
- ANDREWS, J. H. & HARRIS R. F. (2000). The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* , 38, pp. 145–180.
- ARNOLD, D. L., PITMAN, A., e JACKSON, R. W. (2003). Pathogenicity and other genomic islands in plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* , 4, pp. 407-420.
- AZEVEDO, M. O. e organizadores. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003.
- BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L. e DOEBEREINER, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae*, a root-associated nitrogen fixing bacterium. *Intl. J. Sys. Bact.* , 36, pp. 86-93.
- BALDANI, V. L.D., BALDANI, J.I. e DOEBEREINER, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fertil. Soils* , 30, pp. 485-491.



BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I., OLIVARES F.L. e DÖBEREINER, J. (1992a). Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* , 19, pp. 65–73.

BALDANI, V.L.D., JAMES, E.K., BALDANI, J.I. e DÖBEREINER, J. (1992b). Colonization of rice by the nitrogen-fixing bacteria *Herbaspirillum spp.* and *Azospirillum brasilense*. In: *International Congress on Nitrogen Fixation* , 9, p. 860.

BAUMGARTH, B., BARTELS, F. W., ANSELMETTI, D., BECKER, A. e ROS, R. (2005). Detailed studies of the binding mechanism of the *Sinorhizobium meliloti* transcriptional activator ExpG to DNA. *Microbiology* , 151, pp. 259–268.

BODDEY, R.M., DE OLIVEIRA, O. C., URQUIAGA, S., REIS, V.M., DE OLIVARES, F.L., BALDANI, V.L.D. e DÖBEREINER, J. (1995). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* , 174, pp. 195–209.

BOGDANOVE, A.J., BEER, S.V., BONAS, U., BOUCHER, C.A., COLLMER, A., COPLIN, D.L., CORNELIS, G.R., HUANG, H.C., HUTCHESON, S.W., PAPOULOS, J.J. e VAN GIJSEGEN, F. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol* , 20, pp. 681–683.

BOLTON, H., J. K. FREDRIKSON, e ELLIOT, L. E. (1992). Microbial ecology of the rhizosphere. In F. B. Metting, Jr. (ed.), *Soil microbial ecology* , pp. 27–63.

BONAS, U. & VAN DEN ACKERVEKEN, G. (1999). Gene-for-gene interactions: bacterial virulence proteins specify plant disease resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* , 2, pp. 94–98.

BONAS, U., & VAN DEN ACKERVAKEN, G. (1997). Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *Plant. J.* , 12, pp. 1–7.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* , 72, pp. 248–254.

BRENCIC, A. & WINANS, S.C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.* , 69, pp. 155–194.

BRETZ, J., LOSADA, L., LISBOA, K., e HUTCHESON, S.W. (2002). Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.*, 45, pp. 397–409.

BROWN, K. (2001). Florida fights to stop citrus canker. *Science* , 292, pp. 2275–2276.

BRUTINEL, E.D. & YAHR, L.T. (2008). Control of gene expression by type III secretory activity. *Current Opinion in Microbiology* , 11, pp. 128–133.

BURR, S. E., WAHLI, T., SEGNER, H., PUGOVKIN, D., FREY, J. (2003) Association of type III secretion genes with virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Dis. Aquat. Organ.* 57, pp. 167–171

BUTTNER, D. & BONAS, U. (2002). Getting across—Bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* , 21, pp. 5313-5322.

CAMPBELL, E. A. et al. (2002). Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell.* , 3, pp. 527-39.

CHANG, J. H. et al. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl Acad. Sci.* , 102, pp. 2549–2554.

CHATTERJEE, A., CUI, Y. e CHARTTERJEE, A. K. (2002). Regulation of *Erwinia carotovora* *hrpL*(Ecc) (sigma-L(Ecc)), which encodes an extracytoplasmic function subfamily of sigma factor required for expression of the HRP regulon. *Mol. Plant-Microbe Interact.* , 15, pp. 971-980.

CHATTERJEE, A., CUI, Y., LIU, Y., DUMENYO, C. K. e CHATTERJEE, A. K. (1995). Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Appl. Environ. Microbiol.* , 61, pp. 1959-1967.

CHAVES, D.F.S. **Análise e identificação de proteínas celulares e proteínas secretadas por *Herbaspirillum seropedicae*.** Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COLLMER, A., BADEL, J. L., CHARKOWSKI, A. O., DENG, WEN-LING., FOUTS, D. E., RAMOS, A. R., REHM, A. H., ANDERSON, D. M., SCHNEEWIND, O., DIJK, K. VAN e ALFANO, J.R. (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS* , 97, pp. 8770–8777.

CRUZ, L.M., SOUZA, E.M., WEBER, O.B., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. e PEDROSA, F.O. (2001). 16S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). *App. Environ. Microbiol.* , 67, pp. 2375–2379.

CUNNAC, S., BOUCHER, C., e GENIN, S. (2004). Characterization of the cisacting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* , 186, pp. 2309-2318.

da SILVA, A. C. et al. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* , 417, pp. 459–463.

DANGL, J. L., DIETRICH, R. A. , e RICHBERG, M. H. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* , 8, pp. 1793–1807.

DAS, S., CHAKRABORTTY, A., BANERJEE, R., ROYCHOUDHURY, S. e CHAUDHURI, K. (2000). Comparison of global transcription responses allows identification of *Vibrio cholerae* genes differentially expressed following infection. *FEMS Microbiol Lett* , 190, pp. 87-91.

DEAKIN, W. J., & BROUGHTON, W. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature* , pp. 1-9.

DEANE, J.E., ABRUSCI, P., JOHNSON, S. e LEA, S. M. (2009). Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cellular and Molecular Life Sciences* .

DECAD, G.; NIKAIDO, H. (1976). Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria XII Molecular-Sieving Function of Cell Wall. *J. Bacteriol.* , 128, pp. 325-336.

DEDECEK, A.S. **Análise da ilha genômica *hrp/hrc* de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterização parcial dos genes *hrcC*, *hrcV* e *hrpG*.** Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DEGUCHI, Y. et al. (2007). Transcriptome profiling of *Lotus japonicus* roots during arbuscular mycorrhiza development and comparison with that of nodulation. *DNA Res* , 14, pp. 117-133.

DIXON, R. & KAHN, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* , 2, pp. 621-631.

DJORDJEVIC, M. A., GABRIEL, D. W. e ROLFE, B. G. (1987). Rhizobium — the refined parasite of legumes. *Annu. Rev. Phytopathol* , 25, pp. 145-165.

DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. (1987) Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. *Science Tech publishers/Springer-Verlag*.

DÖBEREINER, J. (1992). Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Cienc. Cult.* , 44, pp. 310-313.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V. L. D., BALDANI, J. I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: EMBRAPA – SPI. Itaguari-RJ: EMBRAPA – CNPAB, 60p.

DORMAN, C.J. (1996). Flexible response: DNA supercoiling, transcription and bacterial adaptation to environmental STRESS. *Trends Microbiol.*, 4, pp. 214-216.

EGENER, T., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. (1998) Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Mol Plant Microbe Interact*, 11, pp. 71-75.

ELBELTAGY, A., NISHIOKA, K., SATO, T., SUZUKI, H., YE, B., HAMADA, T., ISAWA, T., MITSUI, H., MINAMISAWA, K. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environ. Microbiol.*, 67, pp. 5285-5293.

ENNINGA, J., & ROSENSHINE, I. (2009). Imaging the assembly, structure and activity of type III secretion systems. *Cellular Microbiology*, 11(10), pp. 1462–1470.

FELIX, G.; DURAN, J.D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 18, pp. 265-276.

FERREIRA, A. O., MYERS, C. R., GORDON, J. S., MARTIN, G. B., VENCATO, M., COLLMER, A., WEHLING, M. D., ALFANO, J. R., MORENO-HAGELSIEB, G., LAMBOY, W. F., DECLERCK, G., SCHNEIDER, D. J., CARTINHO, S. W. (2006) Whole-genome expression profiling defines the *hrpL* regulon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, allows de novo reconstruction of the *hrp cis* element, and identifies novel coregulated genes. *Mol. Plant-Microbe Interaction*. 19, pp. 1167–1179.

FILLOUX, A., HACHANI, A. e BLEVES, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154, pp. 1570–1583.

FOUTS, D. E., ABRAMOVITCH, R. B., ALFANO, J. R., BALDO, A. M., BUELL, C. R., CARTINHO, S., CHATTERJEE, A. K., D'ASCENZO, M., GWINN, M. L., LAZAROWITZ, S. G., LIN, N.-C., MARTIN, G. B., REHM, A. H., SCHNEIDER, D. J., VAN DIJK, K., TANG, X., COLLMER, A. (2002). Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 99, pp. 2275-2280.

FREDERICK, R. D., AHMAD, M., MAJERCZAK, D. R., ARROYO-RODRIGUEZ, A. S., MANULIS, S., e COPLIN, D. L. (2001). Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14, pp. 1213-1222.

FREIBERG, C., FELLAY, R., BAIROCH, A., BROUGHTON, W. J., & ROSENTHAL, A. P. X. (1997). Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, 387, pp. 394-401.

GALÁN, J.E. & COLLMER, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284, pp. 1322-1328.

GAUTHIER, A., T., NIKHIL, A. e FINLAY, B.B. (2003). Bacterial injection machines. *J. Biol. Chem.*, 28, pp. 25273-25276.

- GENIN, S., GOUGH, C. L., ZISCHEK, C., BOUCHER, C. A. (1992). Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.*, 6, pp. 3065-3076.
- GERLACH R. G., HENSEL M. (2007). Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, pp. 401-415.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.*, 7, pp. 251-256.
- GOPHNA, U., RON, E. Z., GRAUR, D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, 312, 151–163
- GÖTTFERT, M., RÖTHLISBERGER, S., KÜNDIG, C., BECK, C., MARTY, R. e HENNECKE, H. (2001). Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.*, 183, pp. 1405-1412.
- GRALLA, J.D. & COLLADO-VIDES, J. (1996). Organization and function of transcription regulatory elements. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, pp. 1232-1245.
- GROISMAN, E. A. & OCHMAN, H. (1996). Pathogenicity islands: quantum leaps in bacterial evolution. *Cell*, 87, pp. 791–794.
- GUO, Y. & GRALLA, J.D. (1997). DNA-binding determinants of sigma 54 as deduced from libraries of mutations. *J. Bacteriol.*, 179, pp. 1239-1245.
- HACKER, J., BLUM-OEHLER, G., MUHLDOERFER, I. e TSCHAPE, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.*, 23, pp. 1089–1097.
- HACKER, J.; KAPER, J. B. (2000). Pathogenic islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol*, 54, pp. 641-679.
- HAUSER, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature*, 7, pp. 654-665.
- HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F., DESVAUX, M., FERNANDEZ, R.C. e ALA'ADEEN, D. (2004). Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiol. and Mol. Biology Reviews*, 68, pp. 692–744.
- HENDRICKSON, E. L., GUEVERA, P., AUSUBEL, F. M. (2000). The alternative sigma factor RpoN is required for *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription. *J. Bacteriol.*, 182, pp. 3508-3516.

HIRANO, S. S., & UPPER, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*: a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, pp. 624–653.

HOICZYK, E., ROGGENKAMP, A., REICHENBECHER, M., LUPAS, A., e HEESEMANN, J. (2000). Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.*, 19, pp. 5989–5999.

HOLLAND, B.; SCHMITT, L.; YOUNG, J. (2005) Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol. Membr. Biol.*

HOU, Y. M. (1999). Transfer RNAs and pathogenicity islands. *Trends Biochem. Sci.*, 24, pp. 295-298.

HUBBER, A., VERGUNST, A. C., SULLINVAN, J. T., HOOYKAAS, P. J. J. e RONSON, C. W. (2004). Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Microbiol.*, 54, pp. 561–574.

HUECK, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, pp. 379-433.

HUTCHESON, S. W., BRETZ, J., SUSSAN, T., JIN, S., e PAK, K. (2001). Enhancer- binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J. Bacteriol.*, 183, pp. 5589-5598.

JAMES, E. K., OLIVARES, F. L., BALDANI, J. I., e DOBEREINER, J. (1997). *Herbaspirillum* An Endophytic Diazotrophic Colonizing Vascular Tissue In Leaves Of *Sorghum bicolor* L. Moench. *J. Experimen. Bot.*, 48, pp. 785-797.

JAMES, E.K. & OLIVARES, F.L. . (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17, pp. 77-119.

JAMES, E.K., GYANESHWAR, P., MATHAN, N., BARRAQUIO, W.L., REDDY, P.M., IANNETTA, P.P.M., OLIVARES, F.L. e LADHA, J.K. (2002). Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 15, pp. 894-906.

JHA, G., RAJESHWARli, R. e SONTI, R. V. (2005). Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact*, 18, pp. 891–898.

JIN, Q. & HE, S.Y. (2001). Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science.*, 294, pp. 2556-2558.

JONES, H. E., HOLLANDO, I. B., BAKER, H. L. e CAMPBELL, A.K. (1999). *Escherichia coli* cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  changes highlight-influx mechanisms. *Cell Calcium*, 25, pp. 265–274.

- JONES, J. D. & DANGL, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**, pp. 323–329.
- KAMDAR, H. V., KAMOUN, S., KADO, C. I. (1993). Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analyses. *J. Bacteriol.*, **175**, pp. 2017-2025.
- KANEKO, T., NAKAMURA, Y., SATO, S., ASAMIZU, E., KATO, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IDESAWA, K., ISHIKAWA, A., KAWASHIMA, K., KIMURA, T., KISHIDA, Y., KIYOKAWA, C., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., MATSUNO, A., MOCHIZUKI, Y., NAKAYAMA, S. e NAKAZAKI, N. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.*, **7**, pp. 331-338.
- KARAVOLOS, M. H., ROE, A. J. , WILSON, M., HENDERSON, J., LEE, J.J., GALLY, D. L. e KHAN, C. M. (2005). Type III secretion of the *Salmonella* effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence. *J. Bacteriol.*, **187**, pp. 1559–1567.
- KEEN, N. T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.*, **24**, pp. 447–463.
- KLASSEN, G., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M., FUNAYAMA, S., e RIGO, L. U. (1997). Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, pp. 887-891.
- KLEINER, D., PAUL, W., MERRICK, M. (1988) Construction of multicopy expression vector for regulated over production of protein in *Klebsiella pneumoniae* Gen. *Microbiol.*, **134**, pp. 1779-1784.
- TSUGE, S., FURUTANI, A., FUKUNAKA, R., OKU, T., TSUN, K., OCHIAI, H., INOUE, Y., KAKU, H., KUBO, Y. (2002) Expression of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *hrp* Genes in XOM2, a Novel Synthetic Medium *J. Gen. Plant Pathol.*, **68**, pp. 363-371.
- KUBORI, T., MATSUSHIMA, Y., NAKAMURA, D., URALIL, J., LARA-TEJERO, M., SUKHAN, A., GALAN, J. E., e AIZAWA, S. I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, **280**, pp. 602-605.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. *Nature*, **227**, pP. 680-685.
- LETUNIC, I., COPLEY, R., PILS, B., PINKERT, S., SCHULTZ, J., & BORK, P. S. (2006). Domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.*, **34**, pp. 257-260.
- LI, C. M., BROWN, I., MANSFIELD, J., STEVENS, C., BOUREAU, T., ROMANTSCHUK, M., e TAIRA, S. (2002). The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*, **21**, pp. 1909-1915.

- LIU, Y., CUI, Y., MUKHERJEE, A. e CHATTERJEE, A. K. (1998). Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol. Microbiol.*, 29, pp. 219-234.
- LOHAR, D. P. et al. (2006). Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 140, pp. 221–234.
- LONETTO, M., GRIBSKOV, M. e GROSS, C.A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.*, 174, pp. 3843-3839.
- MACHADO, H. B., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U. e PEDROSA, F.O. (1991). Excretion of ammonia by *Azospirillum brasilense*. *Canadian J. Microbiol.*, 37, pp. 549-553.
- MACHADO, H. B., YATES, M. G., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U., STEFFENS, M. B. R., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O. (1995) The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. *Can J Microbiol*, 41, pp. 674-684.
- MALHOTRA, A., SEVERINOVA, E. e DARST, S.A. (1996). Crystal structure of a sigma 70 subunit fragment from *E. coli* RNA polymerase. *Cell.* , 87(1), pp. 127-36.
- MARLOVITS, T. C., KUBORI, T., SUKHAN, A., THOMAS, D. R., GALAN, J. E., e UNGER, V. M. (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science.*, 306, pp. 1040-1042.
- MERIGHI, M., MAJERCZAK, D. R., STOVER, E. H. e COPLIN, D. L. (2003). The HrpX/HrpY two-component system activates *hrpS* expression, the first step in the regulatory cascade controlling the Hrp regulon in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16, pp. 238-248.
- MERRICK, M., GIBBINS, J. e TOUKDARIAN, A. (1987). The nucleotide sequence of the sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. *Mol. Gen. Genet.*, 210, p. 323-330.
- MERRICK, M. J. (1993). In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol. Microbiol.*, 10, pp. 903-909.
- MICHIELS, J., CHUANWU, X., VERHAERT, J. e VANDERLEYDEN, J. (2002). The Functions of Ca<sup>2+</sup> in bacteria: a role of EF-hand proteins? *TRENDS in Microbiology*, 10, pp. 87-93.
- MICHIELS, T., WATTIAU, P., BRASSEUR, R., RUYSSCHAERT, J. M., e CORNELIS, G. (1990). Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect. Immun*, 58, pp. 2840–2849.
- MILLER, H. J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.



MILLER, V. (2002). Connections between transcriptional regulation and type III secretion? *Curr Opin Microbiol*, 5, pp. 211-215.

MOHR, C. D., MARTIN, D. W., KONYECSNI, W. M., GOVAN, J. R. W., LORY, S. e DERETIC, V. (1990). Role of the far-upstream sites of the *algD* promoter and the *algR* and *rpoN* genes in environmental modulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 172, pp. 6576-6580.

MONTEIRO, R. A., SCHMIDT, M. A., BAURA, V. A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., YATES, M. G., RANDI, M. A. F., PEDROSA, F. O. , SOUZA, E. M. (2008) Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. *Poales*, *Poaceae*). *Genetics and Molecular Biology*, 31, pp. 932-937.

MORELLO, J. E., & COLLMER, A. (2009). *Pseudomonas syringae* HrpP is a type III secretion substrate specificity switch domain protein that is translocated into plant cells but functions atypically for a substrate-switching protein. *J. Bacteriol.*, 191, pp. 3120–3131.

MOUGOUS, J.D. et al. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 312, pp. 526-1530.

MURPHY, P.J., WEXLER, M., GRZEMSKI, W., RAO, J.R. e GORDON, D.M. (1995). Rhizopines—their role in symbiosis and competition. *Soil. Biol. Biochem*, 27, pp. 525–529.

NISSAN, G.; MANULIS, S.; WEINTHAL, D. M.; SESSA, G.; BARASH, I. (2005). Analysis of promoters recognized by HrpL, an alternative sigma-factor protein from *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18, pp. 634-643.

NOEL, L., THIEME, F., NENNSTIEL, U. e BONAS, D. (2002). Two Novel Type III-Secreted Proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* Pathogenicity Island. *Journal of Bacteriology*, 184, pp. 1340–1348.

OHNISHI, K., KUTSUKAKE, K., SUZUKI, H. e LINO, T. (1990). Gene *fliA* encodes an alternate sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.*, 221, pp. 139-147.

OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L. D., REIS, V. M., BALDANI, J. I. e DÖBEREINER, J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Fertil. Soils*, 21, pp. 197-200.

OLIVARES, F., & BALDANI, J. e. (1995). Infection and colonization of sugarcane by the nitrogen fixing bacteria *Herbaspirillum* spp. In: *Interamerican Conference on Electron Microscopy*, 3, Meeting of the Brazilian Society for Electron Microscopy, p. 282.

OLIVEIRA, A. U., DÖBEREINER, J., & BALDANI, J. (2002). The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil*, 242, pp. 205 – 215.

PAGET, M. S. B.; HELMANN, J. D. (2003). The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.*, 4, pp. 203.1-203.6.

PEDROSA, F.O., TEIXEIRA, K. R. S., MACHADO, I. M. P., STEFFENS, M. B. R., KLASSEN, G., BENELLI, E. M., MACHADO, H. B., FUNAYAMA, S., RIGO, L. U.; ISHIDA, M. L., YATES, M. G., SOUZA, E. M. (1997) Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. *Soil Biol. Biochem*, 29, pp. 843-846.

PEDROSA, F.O., BENELLI, E.M., YATES, M.G., WASSEM, R., MONTEIRO, R. A., KLASSEN, G., STEFFENS, M.B.R., SOUZA, E.M., CHUBATSU, L.S., RIGO, L.U. (2001). Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae* . *Journal of Biotechnol*, 91, pp. 189-195.

PETNICKI-OCWIEJA, T. et al. (2002). Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl Acad. Sci*, 99, pp. 7652–7657.

PIMENTEL, J.P., OLIVARES, F., PITARD, R.M., URQUIAGA, S., AKIBA, F. e DOBEREINER, J. (1991). Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil*, 137, pp. 61-65.

POZIDIS, C. et al. (2003) Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.*, 278, pp. 25816–25824.

PRESTON, G. M., STUDHOLME, D. J. e CALDELARI, I. (2005). Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev*, 29, pp. 331–360.

PÜHLER, A., ARLAT, M., BECKER, A., GOTTFERT, M., MORRISSEY, J.P. e O'GARA, F. (2004). What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, pp. 137-147.

PUKATZKI, S., McAULEY, S., MIYATA, S. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion in Microbiology*, 12, pp. 11-17.

RAHME, L. G., MINDRINOS, M. N., PANOPOULOS, N. J. (1992). Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol* , 174, pp. 3499-3507.

ROINE, E., WEI, W., YUAN, J., NURMIAHO-LASSILA, E. L., KALKKINEN, N., ROMANTSCHUK, M., e HE, S. Y. (1997). Hrp pilus: An *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, pp. 3459-3464.

ROMEIRO, R. S., & RODRIGUES, F. (2007). *Indução de resistência em Plantas a Patógenos*. (Vol. 1). Rio Branco, MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda.

RONCATO-MACCARI, L. D. B., RAMOS, H.J.O., PEDROSA, F.O., ALQUINI, Y., CHUBATSU, L.S., YATES, M.G., RIGO, L.U., STEFFENS, M.B., SOUZA, E.M. (2003b). Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol.*, 45, pp. 39-47.

RONCATO-MACCARI, L.D.B., RAMOS, H.J.O., PEDROSA, F.O., ALQUINI, Y., CHUBATSU, L.S., YATES, M.G., RIGO, L.U., STEFFENS, M.B.R., SOUZA, E. M. (2003a). Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. *Symbiosis*, 35, pp. 01-10.

ROY-BURMAN, A. *et al.* (2001) Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.*, 183, 1767–1774.

SAIER, M. H. (2004). Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol*, 12, pp. 113-15.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2 ed.). New York: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SAMUDRALA, R., HEFFRON, F. e McDERMOTT, J. E. (2009). Accurate prediction of secreted substrates and identification of a conserved putative secretion signal for type III secretion systems. *PLoS Pathog.*, 5.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74, pp 5463-5467.

SASSE-DWIGHT, S. & GRALLA, J.D. (1990). Role of eukaryotic type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor sigma factor 54. *Cell*, 62, pp. 945-954.

SCHMID, M., BALDANI, J. e HARTMANN, A. (2006). The Prokaryotes. *Springer*.

SHAN, L., HE, P., ZHOU, J. M. e TANG, X. (2000). A cluster of mutations disrupt the avirulence but not the virulence function of AvrPto. *Mol. Plant Microbe Interact*, 13, pp. 592–598.

SIMEONE, R., BOTTAI, D. e BROSCH, R. (2009). ESX/type VII secretion systems and their role in host–pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, 12, pp. 4-10.

SIMON, R., PRIEFER, U., & PÜHLER, A. (1983). A broad-host-range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology*, 1, pp. 784-791.

SOSCIA, C.; HACHANI, A.; BERNADAC, A.; FILLOUX, A.; BLEVES, S. (2007) Cross talk between type III Secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 189, pp. 3124-3132.

- SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. (1995) Deletions analysis of the promoter region of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae*. In: *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p.260, 1995.
- SPAINK, H.P., OKKER, R.J.H., WIJFFELMAN, C.A., PEES, E., LUGTENBERG, B.J.J. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol*, 9, pp.27–39.
- TANG, X.; XIAO, Y. e ZHOU, J. (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *MPMI.*, 19, pp. 1159-1166.
- TAYLOR, M., BUTLER, R., CHAMBERS, S., CASIMIRO, M., BADII, M. e MERRICK, F. (1996). The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor  $\sigma^N$  plays a role in promoter recognition. *Mol. Microbiol.*, 22, pp. 1045-1054.
- THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, pp. 420-430.
- THANASSI, D. G.; SAULINO, E.T.; HULTGREN, S.J. (1998) The chaperone/Usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1 (2), pp. 223-231.
- TOTH, I. K. & BIRCH, P. R. (2005). Rotting softly and stealthily. *Curr. Opin. Plant Biol*, 8, pp. 424-429.
- TROISFONTAINES, P. & CORNELIS, G. R. (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)*, 20, pp. 326–339.
- TSUGE, S., FURUTANI, A., FUKUNAKA, R., OKU, T., TSUN, K., OCHIAI, H., INOUE, Y., KAKU, H. e KUBO, Y. (2002). Expression of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *hrp* Genes in XOM2, a Novel Synthetic Medium. *J. Gen. Plant Pathol* , 68, pp. 363-371.
- VAN DEN ACKERVEKEN, G., U. BONAS. (1997). Bacterial avirulence proteins as triggers of plant disease resistance. *Trends Microbiol.*, 5, pp. 394–398.
- VAN GIJSEGEM, F., VASSE, J., CAMUS, J. C., MAREDA, M., e BOUCHER, C. (2000). *Ralstonia solanacearum* produces *hrp*-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.*, 36, pp. 249-260.
- VIPREY, V., DEL GRECO, A., GOLINOWSKI, W., BROUGHTON, W. J. e PERRET, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.*, 28, pp. 1381–1389.
- WATERMAN, S. R. & HOLDEN, D. W. (2003) Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island type III secretion system. *Cell Microbiol.*5, pp. 501–511.

- WEBER, E., OJANEN-REUHS, T., HUGUET, E., HAUSE, G., ROMANTSCHUK, M., KORHONEN, T. K., BONAS, U. e KOEBNIK, R. (2005). The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.*, 187, pp. 2458-2468.
- WEI, Z. M. & BEER, S. V. (1995). *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J. Bacteriol.*, 177, pp. 6201-6210.
- WELCH, R. A., DELLINGER, P., MINSHEW, B., & FALKOW, S. (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature*, 294, pp. 665-667.
- WENGELNIK, K. & BONAS, U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*, 178, pp. 3462-3469.
- WOËSTEN, M.M.S.M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiology Reviews*, 22, pp. 127-150.
- XIAO, F., GIAVALISCO, P.; MARTIN, G.B. (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrPtoB is phosphorylated in plant cells on serine 258, promoting its virulence activity. *J. Biol. Chem.*, 282, pp. 30737-30744.
- XIAO, Y., HEU, S., YI, J., LU, Y. e HUTCHESON, S. W. (1994). Identification of a Putative Alternate Sigma Factor and Characterization of a Multicomponent Regulatory Cascade Controlling the Expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss6l *hrp* and *hrmA* Genes. *Journal of Bacteriology*, 176, pp. 1025-1036.
- YANG, S., PENG, Q., SAN FRANCISCO, M., WANG, Y. e ZENG, Q. (2008). Type III Secretion System Genes of *Dickeya dadantii* 3937 Are Induced by Plant Phenolic Acids. *PLoS ONE*, 3(8), p. e2973.
- ZHOU, D. & GALAN, J. (2001) *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.*, 3, pp. 1293–1298.